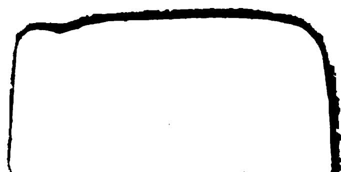




ANNALI

D'IGIENE SPERIMENTALE

PUBBLICATI DAI PROFESSORI

L. ARMANNI (Napoli) — G. BORDONI-UFFREDUZZI (Milano) — P. CANALIS (Genova) — A. CELLI (Roma) — V. DE GIAXA (Napoli) — E. DI MATTEI (Catania) — A. DI VESTEA (Pisa) — A. MAGGIORA (Modena) — L MANFREDI (Palermo) — G. ROSTER (Firenze) — G. SANARELLI (Montevideo) — F. SANFELICE (Cagliari) — A. SERAFINI (Padova) — G. SORMANI (Pavia) — G. ZIINO (Messina)

E DIRETTI DAL

Prof. ANGELO CELLI

(Continuazione degli *Annali dell'Istituto d'Igiene sperimentale dell'Università di Roma*)

Volume VIII (nuova Serie) — 1898

con 5 tavole litografiche

ROMA

Società Editrice Dante Alighieri

1898

INDICE

DEL VOLUME OTTAVO (NUOVA SERIE)

(1898)

Del modo di comportarsi del sistema ganglionare linfatico rispetto ai microrganismi. — Parte seconda: I gangli linfatici nelle infezioni, per **G. Perez** . . . . *Pag.* 1

Lo streptococcus equi — Ricerche sperimentali dei Dottori **Ettore Cappelletti** e **Michelangelo Vivaldi**, Assistenti . . . . » 104

Sulla tossicità del bacillo di Loeffler in rapporto alla sua morfologia, per **Luigi** Prof. **Concetti**, Direttore della Clinica e **Giovanni Memmo**, Assistente . . . . » 119

Sull'agglutinazione come mezzo diagnostico del bacillo tifico, per i Dottori **E. Puppo**, Preparatore all' Istituto d' Igiene di Montevideo e **V. Ottoni**, Preparatore alla Facoltà di Medicina di Rio de Janeiro » 145

Influenza delle lesioni dei centri nervosi sulla immunità passiva — Ricerche sperimentali del Dott. **N. Palermo** . . . . » 155

Sulle dermatosi nelle autointossicazioni e nelle intossicazioni batteriche sperimentali — Ricerche del Dott. **B. Frisco** (con una tavola) » 164

Sulle condizioni igieniche del Cimitero comunale di Roma al Campo Verano — Ricerche del Dott. **Saverio Santori** . . . . . . » 179

Contributo allo studio sperimentale del potere disinfettante dei saponi comuni, pel Prof. Dott. **A. Serafini** . . . . » 199

Sulla differenza fra le carni di cavallo e quelle di bue o di maiale fresche o conservate — Studio critico di alcuni metodi per **Francesco Battelli** . . . . » 222

Il saccharomyces guttulatus (Rob.) — Osservazioni dei Dottori **O. Casagrandi** e **L. Buscalioni** . . . . » 229

Studio sulla rabbia — Memoria I — La rabbia sperimentale nel lupo. — Ricerche del Prof. Dott. **Eugenio Di Mattei** . . . . . . » 244

Sulla trasmissione della Peste bubbonica per le vie digerenti, per i Dottori **Ivo Bandi** e **Francesco Stagnitta Balistreri** . . . » 291

Su alcune cause della non coltivabilità dei blastomiceti inoculati nell'organismo animale — Ricerche del Dott. **O. Casagrandi** . . » 306

Sulla diagnosi differenziale dei blastomiceti — Ricerche del Dottor **O. Casagrandi** . . . . *Pag.* 318

Il grado di assimilabilità del pane — Ricerche dei Dottori **T. Jacoangeli** e **A. Bonanni** . . . . » 354

Sopra una malattia degli ovini — Memoria I pei dottori **F. Mercanti** Direttore e **S. Dessy** Vice-Direttore. . . . . » 381

Ricerche sulla aerobiosi del bacillo del tetano pel dott. **Francesco Valagussa** (con una tavola). . . . . » 396

L'influenza dei sali minerali sulla termogenesi animale — Ricerche calorimetriche dei Dottori **A. Insinna** e **G. Dolce** . . . . . » 420

Descrizione del calorimetro ad aria di Rubner e modo di usarlo, pel Dott. **A. Insinna,** Assistente (con una figura intercalata nel testo). » 446

Influenza dei gangli linfatici nella produzione della immunità verso le malattie infettive — Ricerche sperimentali del Prof. **Luigi Manfredi** e Dott. **Pietro Viola**. . . . . » 456

Istituto d'Igiene della R. Università di Palermo

Del modo di comportarsi del sistema ganglionare linfatico rispetto ai microrganismi.

PARTE SECONDA:

I GANGLI LINFATICI NELLE INFEZIONI

PER

G. PEREZ

INTRODUZIONE.

È noto che in molte e svariate infezioni i gangli linfatici sono fra tutti gli altri organi dell'economia i primi ad essere colpiti dal processo morboso. Ciò è dimostrato non solo dalle osservazioni cliniche, ma anche dai fatti sperimentali, fra cui basta citare le esperienze di Colin, [1] Toussaint, [2] Rodet, [3] Straus, [4] ed altri sull'infezione carbonchiosa. per convincersi come sia appunto nei gangli linfatici che già, fin dai primi momenti della penetrazione del virus, s'impegna la lotta contro i microrganismi invasori. È anzi dall'esame dei gangli linfatici che sovente si può risalire alla lesione iniziale e seguire gradatamente l'evoluzione di determinate forme morbose.

La tumefazione poi delle glandole linfatiche, il così detto *ingorgo glandolare*, è assai frequente ad osservarsi: basta la più piccola lesione sia della superficie di rivestimento, sia dei visceri profondi, perchè questa si ripercuota sul sistema ganglionare linfatico.

Chauffard [5] distingue diversi tipi anatomici di reazione dei gangli linfatici nelle infezioni, e considera il tipo di reazione ganglionare *uniregionale*

[1] *Sur le développement successif de foyers virulents pendant la période de incubation des maladies charbonneuses.* Bull. de l'Acad. de méd., 1878.

[2] *Recherches expérimentales sur la maladie charbonneuse.* Paris, 1879.

[3] *Contribution à l'étude expérimentale du charbon bactéridien.* Thése de Lyon, 1881.

[4] *Le charbon des animaux et de l'homme.* Paris, 1887.

[5] *Les étapes lymphatiques de l'infection.* La Semaine médicale, 1894, pagina 310.

caratterizzato dall'intumescenza dei soli gangli della regione vicina al punto leso, come per esempio avviene nella blenorragia, nel carcinoma, nelle angini acute, nella difterite, nella tubercolosi pulmonare; il tipo di reazione *multiregionale*, in cui cioè si ha, come per esempio nella sifilide, la tumefazione dei gangli linfatici di diverse regioni; ed un 3° tipo, quello cioè di reazione ganglionare *generalizzata*, in cui tutti i gangli linfatici dell'organismo subiscono l'influenza del processo infettivo, come si constata nelle adeniti multiple, sia di natura tubercolare, sia anche determinate da altri agenti infettivi.

Ma se clinicamente è abbastanza bene conosciuta la maniera con cui il sistema gangliare linfatico partecipa alle infezioni, tuttavia poco o nulla si conosce dell'azione intima, che il medesimo esercita sui microbi, che in tali processi infettivi penetrano in grande quantità nell'organismo.

Le ricerche di Follin, di Virchow, di Ranvier [1] e di altri sulla presenza di granulazioni pigmentarie nei gangli linfatici d'individui, sottoposti alla iniezione di polveri coloranti nel cellulare sottocutaneo, avevano già da tempo richiamata l'attenzione sui gangli linfatici, come organi di protezione dell'economia.

Studi più recenti, fra cui meritano di essere citate le esperienze del Giunti, [2] eseguite nella Clinica del prof. Biondi, con le quali si dimostra che, iniettando dell'inchiostro di china nello spessore della mucosa linguale, questo si diffonde attraverso la via linfatica, per arrestarsi ai gangli cervicali, hanno sempre meglio confermata la detta ipotesi; ed oggi dopo che le osservazioni cliniche costantemente ripetute, hanno fatto conoscere la maniera di reagire dei gangli nelle infezioni neoplastiche e microbiche, i patologi non esitano più a considerare le glandole linfatiche come *organi di arresto dei microrganismi.* [3]

Manca però un'esatta dimostrazione sperimentale di tale fatto, come pure resta ancora a spiegarsi per quale potere i gangli linfatici esercitano il loro ufficio di organi protettori dell'economia.

È questo appunto lo studio che mi son proposto nella 2ª parte del presente lavoro, la ricerca cioè dei poteri che il sistema ganglionare linfatico spiega di fronte ai batteri, che continuamente, e talvolta in numero notevole, invadono l'organismo animale.

---

[1] Citati da Léiars; vedi Duplay e Reclus. *Trattato di chirurgia*; vol. I, parte 2ª, p. 193.

[2] *Sugli effetti dell'iniezione di inchiostro di china nello spessore della mucosa linguale di alcuni animali.* Riforma medica, agosto, 1896.

[3] Vedi Duplay et Reclus, loc. cit.

I.

Persistenza dei batteri saprofiti e patogeni nei gangli linfatici degli animali che sopravvivono alle inoculazioni dei medesimi.

Partendo dal concetto, già sostenuto nella 1ª parte del presente lavoro, che cioè i gangli linfatici di fronte ai microrganismi, si comportano in una maniera differente dagli altri organi dell'economia, ho voluto, vedere se, quando l'animale sopravvive ad una data infezione, i microrganismi, che lo hanno invaso, possano conservarsi nei gangli linfatici più a lungo che negli altri organi.

Poco invero si conosce intorno alla persistenza dei batteri patogeni nei tessuti degli animali che non soccombono alle infezioni.

Wyssokowitsch, [1] il quale ha fatto delle ricerche sull'eliminazione dei batteri dall'organismo, ha constatato che i microbi, iniettati nel sangue, non restano lungo tempo nella circolazione generale, in media vi si riscontrano solo nelle prime ore dopo l'inoculazione; essi sono invece trattenuti dai vari organi, in ispecie dalla milza e dal fegato, ma vi soggiornano per un tempo abbastanza breve.

I batteri saprofiti infatti, ad eccezione del *bacillus subtilis* sporificato, il quale 62, ed anche 78 giorni dopo l'inoculazione, è stato rinvenuto nella milza, nel fegato ed in qualche altro organo, scompaiono in media dopo 24 ore dall'organismo animale. I batteri patogeni al contrario si moltiplicano nei detti organi, sino a che invadono un'altra volta il sangue, determinando l'infezione generale e la morte dell'animale.

Trapeznikoff [2] ha confermato le esperienze di Wyssokowitsch, riguardo alla prolungata persistenza del *bacillus subtilis* nell'organismo, ed ha inoltre dimostrato che talvolta le spore dei microrganismi possono, incorporate dai fagociti, soggiornare per lungo tempo nei diversi organi dell'economia, mantenendovisi vitali e virulente.

Pernice e Scagliosi [3] hanno constatato che l'eliminazione dei batteri dall'organismo incomincia 6-8 ore dopo l'inoculazione, e dura per le specie patogene sino alla morte, per le non patogene da 24-48 ore. Nel punto di inoculazione i detti germi persistono sino all'ottavo o decimo giorno, e si trovano incapsulati nei tessuti vicini.

Nelle esperienze che vengo ad esporre mi sono esclusivamente occupato

---

[1] *Ueber die Schicksale der in's Blut injicirten Mikroorganismen in Körper der Warmblüter.* — Zeitschrift für Hygiene, Bd. I, 1886, p. 3.

[2] *Du sort des spores de microbes dans l'organisme animal.* — Ann. de l'Institut Pasteur, t. V, 1891, p. 362.

[3] *Sull'eliminazione dei batteri dall'organismo.* — Rif. med., 1892, n. 97 e 98.

della ricerca dei microrganismi nei vari organi degli animali che *sopravvivono* a determinate infezioni. Su tale argomento abbiamo solo delle osservazioni cliniche assai importanti, specialmente riguardo alla persistenza del bacillo del tifo nell'organismo, le ricerche cioè di Fränkel, Quincke, Finkler, [1] Chantemesse, [2] i quali, passando in rassegna vari casi di recidive di febbri tifoidi, avvenute alcuni mesi dopo l'infezione primitiva, hanno emesso l'ipotesi che i detti germi sieno rimasti nell'organismo allo stato latente, pur conservando l'attitudine a determinare l'infezione.

Le mie ricerche verrebbero a confermare e ad illustrare tale ipotesi non solo per il bacillo del tifo, ma anche per gli altri microrganismi in genere, dimostrando che i batteri possono per lungo tempo conservarsi vitali nell'organismo, e precisamente nei gangli linfatici.

Ho sperimentato tanto con batteri saprofiti, quanto con batteri patogeni, inoculandone una dose non letale nel cellulare sottocutaneo di animali sia recettivi che refrattari. Gli animali 1-2 giorni al più dopo l'inoculazione si rimettevano completamente, e venivano uccisi dopo un numero variabile di giorni.

Di ciascun animale si sono praticati, con la tecnica descritta nella prima parte del presente lavoro, degl' innesti dai principali organi, inclusi i gangli linfatici, dal tessuto cellulo-adiposo del punto d'inoculazione, dal sangue e dalla midolla delle ossa.

Di ogni organo si sono presi dei cubi di $^1|_2$ cm. circa per sperimentare approssimativamente su di una stessa quantità di materiale; per il sangue e per la midolla delle ossa gl' innesti si sono eseguiti prendendo una o due anse del materiale, ed innestandole direttamente nelle provette con dell'agar. Quanto ai gangli linfatici gl' innesti sono stati praticati dai principali gangli sottocutanei e mesenterici, distribuendoli in due provette distinte. La quantità di materiale con cui si è praticato l'innesto è stata di $^1|_2$-1 cmc. circa, e ciò tanto nel caso in cui si è avuto da fare con piccoli animali, quanto nei casi in cui si è sperimentato su grossi animali, quali ad esempio i cani.

Gl' innesti inoltre dei gangli linfatici sottocutanei, quando l'animale veniva ucciso nei primi giorni dopo l'inoculazione, si sono praticati non dai gangli linfatici vicini al punto d'inoculazione, ma da quelli posti ad una certa distanza, appunto per evitare che i germi, trovantisi nel punti d'inoculazione, potessero restare attaccati alla superficie delle dette glandole.

Quando però si aveva la completa scomparsa dei germi dal cellulare del punto d'inoculazione, gl' innesti si sono eseguiti anche dai gangli linfatici vicini.

---

1 *Ueber Falle von ausserordentlich spat, nach mehreren Monaten erst, auftretenden Recidiven von Typhoid.* — Centralblatt f. Bakt., Bd. I, 1887, p. 546.

2 *Durée de la survivance du bacille typhique dans l'organisme.* — La Semaine méd., 1890, n. 30.

A. — Inoculazioni di batteri saprofiti

Si sono scelti in queste esperienze tanto dei batteri rinvenuti normalmente nei gangli linfatici, come il *mesentericus fuscus*, quanto dei batteri che non si sono mai nei medesimi riscontrati, come il *batterio prodigioso.*

TABELLA I — *Esperienze eseguite con il bacillus mesentericus fuscus.*

Animali da esperimento	Quantità di cultura inoculata	Tempo dopo il quale si uccideva l'animale	Numero delle colonie di mesentericus fuscus rinvenute nei principali organi e tessuti dell'economia	
Cavia . .	1 cc. di cultura in brodo di 3 giorni.	24 ore	Cellulare sottocutaneo, corrispondente al punto d'inoculazione	373
			Sangue	12
			Milza	20
			Fegato	—
			Rene	—
			Midolla delle ossa	6
			Gangli linfatici sottocutanei distanza	53
			Gangli linfatici mesenterici.	38
Cavia . .	1 cc. di cultura in brodo di 3 giorni	24 ore	Cellulare sottocutaneo corrispondente al punto d'inoculazione	248
			Sangue	6
			Milza	15
			Fegato	3
			Rene	3
			Midolla delle ossa	15
			Gangli linfatici sottocutanei a distanza.	42
			Gangli linfatici mesenterici.	25

Segue TAB. I — *Esperienze eseguite con il bacillus mesentericus fuscus.*

Animali da esperimento	Quantità di coltura inoculata	Tempo dopo il quale si uccideva l'animale	Numero delle colonie di mesentericus fuscus rinvenute nei principali organi e tessuti dell'economia	
Cavia . .	1 cc. di coltura in brodo di 8 giorni.	4 giorni	Cellulare sottocutaneo corrispondente al punto d'inoculazione	—
			Sangue	—
			Milza	—
			Fegato.	—
			Rene	8
			Midolla delle ossa	—
			Gangli linfatici sottocutanei vicini e a distanza . . .	149
			Gangli linfatici mesenterici.	75
Cavia . .	1 cc. di coltura in brodo di 8 giorni.	4 giorni	Cellulare sottocutaneo corrispondente al punto d'inoculazione	—
			Sangue	—
			Milza	—
			Fegato.	—
			Rene	5
			Midolla delle ossa	—
			Gangli linfatici sottocutanei vicini e a distanza . . .	153
			Gangli linfatici mesenterici.	69
Cavia . .	1 cc. di coltura in brodo di 8 giorni.	6 giorni	Cellulare sottocutaneo corrispondente al punto d'inoculazione	—
			Sangue	—
			Milza	—
			Fegato.	6
			Rene	12
			Midolla delle ossa	—
			Gangli linfatici sottocutanei vicini e a distanza . . .	99
			Gangli linfatici mesenterici.	47

Segue TAB. I — *Esperienze eseguite con il bacillus mesentericus fuscus.*

Animali da esperimento	Quantità di coltura inoculata	Tempo dopo il quale si uccideva l'animale	Numero delle colonie di mesentericus fuscus rinvenute nei principali organi e tessuti dell'economia	
Cavia . .	1 cc. di coltura in brodo di 8 giorni.	6 giorni	Cellulare sottocutaneo corrispondente al punto d'inoculazione	—
			Sangue	—
			Milza	—
			Fegato.	2
			Rene	6
			Midolla delle ossa	1
			Gangli linfatici sottocutanei vicini e a distanza . . .	178
			Gangli linfatici mesenterici.	102
Cavia . .	1 cc. di coltura in brodo di 8 giorni.	9 giorni	Cellulare sottocutaneo corrispondente al punto d'inoculazione	—
			Sangue	—
			Milza	—
			Fegato.	—
			Rene	8
			Midolla delle ossa	1
			Gangli linfatici sottocutanei vicini e a distanza . . .	972
			Gangli linfatici mesenterici.	589
Cavia . .	1 cc. di coltura in brodo di 8 giorni.	9 giorni	Cellulare sottocutaneo corrispondente al punto d'inoculazione	—
			Sangue	—
			Milza	2
			Fegato	—
			Rene	4
			Midolla delle ossa	1
			Gangli linfatici sottocutanei vicini e a distanza . . .	872
			Gangli linfatici mesenterici.	789

Segue TAB. I — *Esperienze eseguite con il bacillus mesentericus fuscus.*

Animali da esperimento	Quantità di coltura inoculata	Tempo dopo il quale si uccideva l'animale	Numero delle colonie di mesentericus fuscus rinvenute nei principali organi e tessuti dell'economia	
Cavia . .	1 cc. di coltura in brodo di 3 giorni.	15 giorni	Cellulare sottocutaneo corrispondente al punto d'inoculazione	—
			Sangue	—
			Milza	3
			Fegato.	1
			Rene	3
			Midolla delle ossa	—
			Gangli linfatici sottocutanei vicini e a distanza . . .	1873
			Gangli linfatici mesenterici.	1256
Cavia . .	1 cc. di coltura in brodo di 3 giorni.	15 giorni	Cellulare sottocutaneo corrispondente al punto d'inoculazione	—
			Sangue	—
			Milza	—
			Fegato.	—
			Rene	2
			Midolla delle ossa	—
			Gangli linfatici sottocutanei vicini e a distanza . . .	979
			Gangli linfatici mesenterici.	847
Cavia . .	1 cc. di coltura in brodo di 3 giorni.	25 giorni	Cellulare sottocutaneo corrispondente al punto d'inoculazione	—
			Sangue	—
			Milza	—
			Fegato	—
			Rene	2
			Midolla delle ossa	—
			Gangli linfatici sottocutanei vicini e a distanza . . .	1982
			Gangli linfatici mesenterici.	1075

Segue TAB. I — *Esperienze eseguite con il bacillus mesentericus fuscus.*

Animali da esperimento	Quantità di coltura inoculata	Tempo dopo il quale si uccideva l'animale	Numero delle colonie di mesentericus fuscus rinvenute nei principali organi e tessuti dell'economia	
Cavia . .	1 cc. di coltura in brodo di 8 giorni.	80 giorni	Cellulare sottocutaneo corrispondente al punto d'inoculazione	—
			Sangue	—
			Milza	12
			Fegato.	8
			Rene	—
			Midolla delle ossa	—
			Gangli linfatici sottocutanei vicini e a distanza . . .	1018
			Gangli linfatici mesenterici.	1701
Cavia . .	1 cc. di coltura in brodo di 8 giorni.	40 giorni	Cellulare sottocutaneo corrispondente al punto d'inoculazione	—
			Sangue	—
			Milza	2
			Fegato	—
			Rene	—
			Midolla delle ossa	—
			Gangli linfatici sottocutanei vicini e a distanza. . .	907
			Gangli linfatici mesenterici.	898
Cavia . .	1 cc. di coltura in brodo di 8 giorni.	62 giorni	Cellulare sottocutaneo corrispondente al punto d'inoculazione	—
			Sangue	—
			Milza	—
			Fegato.	—
			Rene	—
			Midolla delle ossa	—
			Gangli linfatici sottocutanei vicini e a distanza . . .	98
			Gangli linfatici mesenterici.	61

Segue TAB. I — *Esperienze eseguite con il bacillus mesentericus fuscus.*

Animali da esperimento	Quantità di coltura inoculata	Tempo dopo il quale si uccideva l'animale	Numero delle colonie di mesentericus fuscus rinvenute nei principali organi e tessuti dell'economia	
Cavia . .	1 cc. di coltura in brodo di 3 giorni.	75 giorni	Cellulare sottocutaneo corrispondente al punto d'inoculazione	—
			Sangue	—
			Milza	—
			Fegato.	2
			Rene	—
			Midolla delle ossa	—
			Gangli linfatici sottocutanei vicini e a distanza . . .	45
			Gangli linfatici mesenterici.	39
Cavia . .	1 cc. di coltura in brodo di 3 giorni.	84 giorni	Cellulare sottocutaneo corrispondente al punto d'inoculazione	—
			Sangue	—
			Milza	—
			Fegato	—
			Rene	—
			Midolla delle ossa	—
			Gangli linfatici sottocutanei vicini e a distanza . . .	33
			Gangli linfatici mesenterici.	21
Cavia . .	1 cc. di coltura in brodo di 3 giorni.	Tre mesi	Cellulare sottocutaneo corrispondente al punto d'inoculazione	—
			Sangue	—
			Milza	—
			Fegato.	—
			Rene	—
			Midolla delle ossa	—
			Gangli linfatici sottocutanei vicini e a distanza . . .	19
			Gangli linfatici mesenterici.	12

TABELLA II — *Esperienze con il batterio prodigioso.*

Animali da esperimento	Quantità di coltura inoculata	Tempo dopo il quale si uccideva l'animale	Numero delle colonie di batterio prodigioso rinvenute nei principali organi e tessuti dell'economia	
Cavia . .	1/100 di coltura di 24 ore di grosso tubo d'agar a becco di flauto.	24 ore	Cellulare sottocutaneo corrispondente al punto d'inoculazione	129
			Sangue	3
			Milza	10
			Fegato	30
			Rene	12
			Midolla delle ossa	6
			Gangli linfatici sottocutanei a distanza.	107
			Gangli linfatici mesenterici.	98
Cavia . .	1/100 di coltura di 24 ore di grosso tubo d'agar a becco di flauto.	24 ore	Cellulare sottocutaneo corrispondente al punto d'inoculazione	102
			Sangue	1
			Milza	12
			Fegato.	49
			Rene	7
			Midolla delle ossa	3
			Gangli linfatici sottocutanei a distanza.	92
			Gangli linfatici mesenterici .	79
Cavia . .	1/100 di coltura di 24 ore di grosso tubo d'agar a becco di flauto.	2 giorni	Cellulare sottocutaneo corrispondente al punto d'inoculazione	59
			Sangue	—
			Milza	7
			Fegato.	15
			Rene	5
			Midolla delle ossa	3
			Gangli linfatici sottocutanei a distanza.	178
			Gangli linfatici mesenterici .	169

Segue TAB. I — *Esperienze eseguite con il bacillus mesentericus fuscus.*

Animali da esperimento	Quantità di coltura inoculata	Tempo dopo il quale si uccideva l'animale	Numero delle colonie di mesentericus fuscus rinvenute nei principali organi e tessuti dell'economia	
Cavia . .	1 cc. di coltura in brodo di 3 giorni.	75 giorni	Cellulare sottocutaneo corrispondente al punto d'inoculazione	—
			Sangue	—
			Milza	—
			Fegato.	2
			Rene	—
			Midolla delle ossa	—
			Gangli linfatici sottocutanei vicini e a distanza . . .	45
			Gangli linfatici mesenterici.	39
Cavia . .	1 cc. di cultura in brodo di 3 giorni.	84 giorni	Cellulare sottocutaneo corrispondente al punto d'inoculazione	—
			Sangue	—
			Milza	—
			Fegato	—
			Rene	—
			Midolla delle ossa	—
			Gangli linfatici sottocutanei vicini e a distanza . . .	33
			Gangli linfatici mesenterici.	21
Cavia . .	1 cc. di cultura in brodo di 3 giorni.	Tre mesi	Cellulare sottocutaneo corrispondente al punto d'inoculazione	—
			Sangue	—
			Milza	—
			Fegato.	—
			Rene	—
			Midolla delle ossa	—
			Gangli linfatici sottocutanei vicini e a distanza . . .	19
			Gangli linfatici mesenterici.	12

TABELLA II — *Esperienze con il batterio prodigioso.*

Animali da esperimento	Quantità di coltura inoculata	Tempo dopo il quale si uccideva l'animale	Numero delle colonie di batterio prodigioso rinvenute nei principali organi e tessuti dell'economia	
Cavia . .	1/100 di coltura di 24 ore di grosso tubo d'agar a becco di flauto.	24 ore	Cellulare sottocutaneo corrispondente al punto d'inoculazione	129
			Sangue	3
			Milza	10
			Fegato	30
			Rene	12
			Midolla delle ossa	6
			Gangli linfatici sottocutanei a distanza.	107
			Gangli linfatici mesenterici.	98
Cavia . .	1/100 di coltura di 24 ore di grosso tubo d'agar a becco di flauto.	24 ore	Cellulare sottocutaneo corrispondente al punto d'inoculazione	102
			Sangue	1
			Milza	12
			Fegato.	49
			Rene	7
			Midolla delle ossa	3
			Gangli linfatici sottocutanei a distanza.	92
			Gangli linfatici mesenterici .	79
Cavia . .	1/100 di coltura di 24 ore di grosso tubo d'agar a becco di flauto.	2 giorni	Cellulare sottocutaneo corrispondente al punto d'inoculazione	59
			Sangue	—
			Milza	7
			Fegato.	15
			Rene	5
			Midolla delle ossa	3
			Gangli linfatici sottocutanei a distanza.	178
			Gangli linfatici mesenterici .	169

Segue TABELLA II — *Esperienze con il batterio prodigioso.*

Animali da esperimento	Quantità di coltura inoculata	Tempo dopo il quale si uccideva l'animale	Numero delle colonie di batterio prodigioso rinvenute nei principali organi e tessuti dell'economia	
Cavia . .	1/100 di coltura di 24 ore di grosso tubo d'agar a becco di flauto.	2 giorni	Cellulare sottocutaneo corrispondente al punto d'inoculazione	47
			Sangue	—
			Milza	5
			Fegato.	9
			Rene	3
			Midolla delle ossa	6
			Gangli linfatici sottocutanei a distanza.	87
			Gangli linfatici mesenterici .	92
Cavia . .	1/150 di coltura di 24 ore di grosso tubo d'agar a becco di flauto.	3 giorni	Cellulare sottocutaneo corrispondente al punto d'inoculazione	39
			Sangue	—
			Milza	3
			Fegato.	—
			Rene	16
			Midolla delle ossa	2
			Gangli linfatici sottocutanei a distanza.	162
			Gangli linfatici mesenterici .	109
Cavia . .	1/100 di coltura di 24 ore di grosso tubo d'agar a becco di flauto.	3 giorni	Cellulare sottocutaneo corrispondente al punto d'inoculazione	42
			Sangue	—
			Milza	5
			Fegato.	1
			Rene	12
			Midolla delle ossa	4
			Gangli linfatici sottocutanei a distanza	103
			Gangli linfatici mesenterici .	92

Segue TABELLA II — *Esperienze con il batterio prodigioso.*

Animali da esperimento	Quantità di coltura inoculata	Tempo dopo il quale si uccideva l'animale	Numero delle colonie di batterio prodigioso rinvenute nei principali organi e tessuti dell'economia	
Cavia . .	1/100 di coltura di 24 ore di grosso tubo d'agar a becco di flauto.	4 giorni	Cellulare sottocutaneo corrispondente al punto d'inoculazione	4
			Sangue	—
			Milza	3
			Fegato.	4
			Rene	32
			Midolla delle ossa	2
			Gangli linfatici sottocutanei a distanza.	123
			Gangli linfatici mesenterici .	107
Cavia . .	1/100 di coltura di 24 ore di grosso tubo d'agar a becco di flauto.	4 giorni	Cellulare sottocutaneo corrispondente al punto d'inoculazione	—
			Sangue	—
			Milza	2
			Fegato.	—
			Rene	12
			Midolla delle ossa	4
			Gangli linfatici sottocutanei a distanza.	221
			Gangli linfatici mesenterici .	197
Cavia . .	1/100 di coltura di 24 ore di grosso tubo d'agar a becco di flauto.	6 giorni	Cellulare sottocutaneo corrispondente al punto d'inoculazione	—
			Sangue	—
			Milza	—
			Fegato.	—
			Rene	—
			Midolla delle ossa	—
			Gangli linfatici sottocutanei a distanza.	208
			Gangli linfatici mesenterici .	292

Segue TABELLA II — *Esperienze con il batterio prodigioso.*

Animali da esperimento	Quantità di coltura inoculata	Tempo dopo il quale si uccideva l'animale	Numero delle colonie di batterio prodigioso rinvenute nei principali organi e tessuti dell'economia	
Cavia . .	1/100 di coltura di 24 ore di grosso tubo d'agar a becco di flauto.	6 giorni	Cellulare sottocutaneo corrispondente al punto d'inoculazione	—
			Sangue	—
			Milza	—
			Fegato.	—
			Rene	3
			Midolla delle ossa	—
			Gangli linfatici sottocutanei vicini e a distanza . . .	298
			Gangli mesenterici	203
Cavia . .	1/100 di coltura di 24 ore di grosso tubo d'agar a becco di flauto.	6 giorni	Cellulare sottocutaneo corrispondente al punto d'inoculazione	—
			Sangue	—
			Milza	—
			Fegato.	2
			Rene	—
			Midolla delle ossa	—
			Gangli linfatici sottocutanei vicini e a distanza . . .	112
			Gangli linfatici mesenterici .	96
Cavia . .	1/100 di coltura di 24 ore di grosso tubo d'agar a becco di flauto.	9 giorni	Cellulare sottocutaneo corrispondente al punto d'inoculazione	—
			Sangue	—
			Milza	—
			Fegato.	—
			Rene	—
			Gangli linfatici sottocutanei vicini e a distanza . . .	28
			Gangli mesenterici	32

Segue TABELLA II — *Esperienze con il batterio prodigioso.*

Animali da esperimento	Quantità di coltura inoculata	Tempo dopo il quale si uccideva l'animale	Numero delle colonie di batterio prodigioso rinvenute nei principali organi e tessuti dell'economia	
Cavia . .	**1/100 di coltura di 24 ore di grosso tubo d'agar a becco di flauto.**	**9 giorni**	**Cellulare sottocutaneo corrispondente al punto d'inoculazione . . . .**	**—**
			Sangue	**—**
			Milza	**—**
			Fegato.	**—**
			Rene	**—**
			Midolla delle ossa	**—**
			Gangli linfatici sottocutanei vicini e a distanza . . .	**98**
			Gangli linfatici mesenterici.	**83**
Cavia . .	**1/100 di coltura di 24 ore di grosso tubo d'agar a becco di flauto.**	**15 giorni**	**Cellulare sottocutaneo corrispondente al punto d'inoculazione . . . .**	**—**
			Sangue	**—**
			Milza	**—**
			Fegato.	**—**
			Rene	**—**
			Gangli linfatici sottocutanei vicini e a distanza . . .	**8**
			Gangli linfatici mesenterici.	**3**
Cavia . .	**1/100 di coltura di 24 ore di grosso tubo d'agar a becco di flauto.**	**15 giorni**	**Cellulare sottocutaneo corrispondente al punto d'inoculazione . . . .**	**—**
			Sangue	**—**
			Milza	**—**
			Fegato.	**—**
			Rene	**—**
			Gangli linfatici sottocutanei vicini e a distanza . . .	**3**
			Gangli linfatici mesenterici.	**1**

Segue TABELLA II — *Esperienze con il batterio prodigioso.*

Animali da esperimento	Quantità di coltura inoculata	Tempo dopo il quale si uccideva l'animale	Numero delle colonie di batterio prodigioso rinvenute nei principali organi e tessuti dell'economia	
Cavia . .	1/100 di coltura di 24 ore di grosso tubo d'agar a becco di flauto.	20 giorni	Cellulare sottocutaneo corrispondente al punto d' inoculazione	—
			Sangue	—
			Milza	—
			Fegato.	—
			Rene	—
			Gangli linfatici sottocutanei e mesenterici	—

B — **Inoculazioni di microrganismi patogeni in animali molto recettivi**

TABELLA III — *Esperienze con lo staphylococcus pyogenes aureus.*

Animali da esperimento	Quantità di coltura inoculata	Tempo dopo il quale si uccideva l'animale	Numero delle colonie di staph. pyogenes aureus rinvenute nei principali organi e tessuti dell'economia	
Cavia . .	1/2 cc. di coltura in brodo di 8 giorni.	24 ore	Cellulare sottocutaneo del punto d'inoculazione . .	850
			Sangue	—
			Milza	82
			Fegato	48
			Rene	57
			Midolla delle ossa	27
			Gangli linfatici sottocutanei a distanza	150
			Gangli linfatici mesenterici .	98
Cavia . .	1/2 cc. di coltura in brodo di 8 giorni.	24 ore	Cellulare sottocutaneo del punto d'inoculazione . .	502
			Sangue	—
			Milza	15
			Fegato	22
			Rene	82
			Midolla delle ossa	9
			Gangli linfatici sottocutanei a distanza	88
			Gangli linfatici mesenterici .	88
Cavia . .	1/2 cc. di coltura in brodo di 8 giorni.	2 giorni	Cellulare sottocutaneo del punto d'inoculazione. . .	205
			Sangue.	—
			Milza	9
			Fegato.	6
			Rene	9
			Midolla delle ossa	5
			Gangli linfatici sottocutanei a distanza	41
			Gangli linfatici mesenterici .	22

Segue TABELLA III — *Esperienze con lo staphylococcus pyogenes aureus.*

Animali da esperimento	Quantità di coltura inoculata	Tempo dopo il quale si uccideva l'animale	Numero delle colonie di staph. pyogenes aureus rinvenute nei principali organi e tessuti dell'economia	
Cavia . .	1/2 cc. di coltura in brodo di 3 giorni.	2 giorni	Cellulare sottocutaneo del punto d'inoculazione . .	199
			Sangue	—
			Milza	12
			Rene	3
			Fegato	7
			Midolla delle ossa	—
			Gangli linfatici sottocutanei a distanza.	32
			Gangli linfatici mesenterici.	27
Cav'a . .	1/2 cc. di coltura in brodo di 3 giorni.	3 giorni	Cellulare sottocutaneo del punto d'inoculazione . .	103
			Sangue	—
			Milza	2
			Fegato.	3
			Rene	2
			Midolla delle ossa	—
			Gangli linfatici sottocutanei a distanza.	29
			Gangli linfatici mesenterici.	31
Cavia . .	1/2 cc. di coltura in brodo di 3 giorni.	3 giorni	Cellulare sottocutaneo del punto d'inoculazione . .	98
			Sangue	—
			Milza	5
			Fegato	2
			Rene	—
			Midolla delle ossa	—
			Gangli linfatici sottocutanei a distanza	28
			Gangli linfatici mesenterici.	30

Segue TABELLA III — *Esperienze con lo staphylococcus pyogenes aureus.*

Animali da esperimento	Quantità di coltura inoculata	Tempo dopo il quale si uccideva l'animale	Numero delle colonie di staph. pyogenes aureus rinvenute nei principali organi e tessuti dell'economia	
Cavia . .	1/2 cc. di coltura in brodo di 3 giorni.	4 giorni	Cellulare sottocutaneo del punto d'inoculazione . .	31
			Sangue	—
			Milza	—
			Fegato	2
			Rene	—
			Midolla delle ossa	—
			Gangli linfatici sottocutanei a distanza	12
			Gangli linfatici mesenterici.	9
Cavia . .	1/2 cc. di coltura in brodo di 3 giorni.	4 giorni	Cellulare sottocutaneo del punto d'inoculazione . .	43
			Sangue	—
			Milza	2
			Fegato	1
			Rene	—
			Midolla delle ossa	—
			Gangli linfatici sottocutanei a distanza	18
			Gangli linfatici mesenterici.	15
Cavia . .	1/2 cc. di coltura in brodo di 3 giorni.	6 giorni	Cellulare sottocutaneo del punto d'inoculazione . .	7
			Sangue.	—
			Milza	—
			Fegato.	2
			Rene	1
			Midolla delle ossa	1
			Gangli linfatici sottocutanei a distanza.	22
			Gangli linfatici mesenterici.	12

Segue TABELLA III — *Esperienze con lo staphylococcus pyogenes aureus.*

Animali da esperimento	Quantità di coltura inoculata	Tempo dopo il quale si uccideva l'animale	Numero delle colonie di staph. pyogenes aureus rinvenute nei principali organi e tessuti dell'economia	
Cavia . .	1/2 cc. di coltura in brodo di 3 giorni.	6 giorni	Cellulare sottocutaneo del punto d'inoculazione . .	15
			Sangue	—
			Milza	—
			Fegato.	—
			Rene	—
			Midolla delle ossa	—
			Gangli linfatici sottocutanei a distanza.	14
			Gangli linfatici mesenterici.	20
Cavia . .	1/2 cc. di coltura in brodo di 3 giorni.	9 giorni	Cellulare sottocutaneo del punto d'inoculazione . .	—
			Sangue	—
			Milza	—
			Fegato.	—
			Rene	1
			Gangli linfatici sottocutanei a distanza	14
			Gangli linfatici mesenterici.	9
Cavia . .	1/2 cc. di coltura in brodo di 3 giorni.	9 giorni	Cellulare sottocutaneo del punto d'inoculazione . .	—
			Sangue.	—
			Milza	—
			Fegato	—
			Rene	—
			Gangli linfatici vicini e a distanza	15
			Gangli linfatici mesenterici.	12

Segue TABELLA III — *Esperienze con lo staphylococcus pyogenes aureus.*

Animali da esperimento	Quantità di coltura inoculata	Tempo dopo il quale si uccideva l'animale	Numero delle colonie di staph. pyogenes aureus rinvenute nei principali organi e tessuti dell'economia	
Cavia . .	1/2 cc. di coltura in brodo di 8 giorni.	15 giorni	Cellulare sottocutaneo del punto d'inoculazione. . .	—
			Sangue.	—
			Milza	—
			Fegato.	—
			Rene	—
			Gangli linfatici sottocutanei vicini e a distanza . . .	21
			Gangli linfatici mesenterici.	15
Cavia . .	1/2 cc. di coltura in brodo di 8 giorni.	25 giorni	Cellulare sottocutaneo del punto d'inoculazione. . .	—
			Sangue.	—
			Milza	—
			Fegato.	—
			Rene	—
			Gangli linfatici sottocutanei vicini e a distanza . . .	8
			Gangli linfatici mesenterici.	5
Cavia . .	1/2 cc. di coltura in brodo di 8 giorni.	25 giorni	Cellulare sottocutaneo del punto d'inoculazione. . .	—
			Sangue	—
			Milza	—
			Fegato.	—
			Rene	—
			Midolla delle ossa	—
			Gangli linfatici sottocutanei vicini e a distanza. . . .	12
			Gangli linfatici mesenterici.	7

Segue TABELLA III — *Esperienze con lo staphylococcus pyogenes aureus.*

Animali da esperimento	Quantità di coltura inoculata	Tempo dopo il quale si uccideva l'animale	Numero delle colonie di staph. pyogenes aureus rinvenute nei principali organi e tessuti dell'economia	
Cavia . .	1/2 cc. di coltura in brodo di 3 giorni.	40 giorni	Cellulare sottocutaneo del punto d'inoculazione . .	—
			Sangue	—
			Milza	—
			Fegato.	—
			Rene	—
			Midolla delle ossa	—
			Gangli linfatici sottocutanei vicini e a distanza . . .	9
			Gangli linfatici mesenterici.	5
Cane . .	1/2 cc. di coltura in brodo di 3 giorni.	24 ore	Cellulare sottocutaneo del punto d'inoculazione . .	1024
			Sangue	4
			Milza	129
			Fegato	47
			Rene	23
			Midolla delle ossa	23
			Gangli linfatici sottocutanei a distanza	981
			Gangli linfatici mesenterici.	723
Cane . .	1/2 cc. di coltura in brodo di 3 giorni.	2 giorni	Cellulare sottocutaneo del punto d'inoculazione . .	704
			Sangue	—
			Milza	39
			Fegato	30
			Rene	9
			Midolla delle ossa	—
			Gangli linfatici sottocutanei a distanza	894
			Gangli linfatici mesenterici.	512

Segue TABELLA III — *Esperienze con lo staphylococcus pyogenes aureus.*

Animali da esperimento	Quantità di coltura inoculata	Tempo dopo il quale si uccideva l'animale	Numero delle colonie di staph. pyogenes aureus rinvenute nei principali organi e tessuti dell'economia	
Cane . .	1/2 cc. di coltura in brodo di 3 giorni.	6 giorni	Cellulare sottocutaneo del punto d'inoculazione . .	15
			Sangue	—
			Milza	2
			Fegato.	2
			Rene	1
			Midolla delle ossa	—
			Gangli linfatici sottocutanei a distanza	97
			Gangli linfatici mesenterici .	68
Cane . .	1/2 cc. di coltura in brodo di 3 giorni.	9 giorni	Cellulare sottocutaneo del punto d'inocuzione . . .	8
			Sangue	—
			Milza	—
			Fegato	—
			Rene	—
			Midolla delle ossa	—
			Gangli linfatici sottocutanei a distanza	22
			Gangli linfatici mesenterici .	9
Cane . .	1/2 cc. di coltura in brodo di 3 giorni.	15 giorni	Cellulare sottocutaneo del punto d'inoculazione . .	—
			Sangue	—
			Milza	—
			Fegato	—
			Rene	1
			Midolla delle ossa	—
			Gangli linfatici sottocutanei a distanza	10
			Gangli linfatici mesenterici .	3

Segue TABELLA III — *Esperienze con lo staphylococcus pyogenes aureus.*

Animali da esperimento	Quantità di coltura inoculata	Tempo dopo il quale si uccideva l'animale	Numero delle colonie di staph. pyogenes aureus rinvenute nei principali organi e tessuti dell'economia	
Cane . .	1/2 cc. di coltura in brodo di 8 giorni.	Un mese	Cellulare sottocutaneo del punto d'inoculazione . .	—
			Sangue	—
			Milza	—
			Fegato	—
			Rene	—
			Midolla delle ossa	—
			Gangli linfatici sottocutanei vicini e a distanza . . .	7
			Gangli linfatici mesenterici.	9

TABELLA IV — *Esperienze con il bacillo del tifo.*

Animali da esperimento	Quantità di coltura inoculata	Tempo dopo il quale si uccideva l'animale	Numero delle colonie di bacillo del tifo rinvenute nei principali organi e tessuti dell'economia	
Cavia . .	1/500 di coltura di 24 ore in grosso tubo d'agar a becco di flauto.	24 ore	Cellulare sottocutaneo del punto d'inoculazione. . .	1059
			Sangue	—
			Milza	66
			Fegato	22
			Rene	6
			Midolla delle ossa	4
			Gangli linfatici sottocutanei a distanza.	984
			Gangli linfatici mesenterici.	482
Cavia . .	1/500 di coltura di 24 ore in grosso tubo d'agar a becco di flauto.	24 ore	Cellulare sottocutaneo del punto d'inoculazione. . .	1200
			Sangue.	—
			Milza	51
			Fegato	18
			Rene	9
			Midolla delle ossa	5
			Gangli linfatici sottocutanei a distanza.	858
			Gangli linfatici mesenterici	612
Cavia . .	1/500 di coltura di 24 ore in grosso tubo d'agar a becco di flauto.	2 giorni	Cellulare sottocutaneo del punto d'inoculazione. . .	712
			Sangue.	—
			Milza	108
			Fegato	15
			Rene	4
			Midolla delle ossa	9
			Gangli linfatici sottocutanei a distanza.	977
			Gangli linfatici mesenterici.	852

Segue TABELLA IV — *Esperienze con il bacillo del tifo.*

Animali da esperimento	Quantità di coltura inoculata	Tempo dopo il quale si uccideva l'animale	Numero delle colonie di bacillo del tifo rinvenute nei principali organi e tessuti dell'economia	
Cavia . .	1/500 di coltura di 24 ore in grosso tubo d'agar a becco di flauto.	2 giorni	Cellulare sottocutaneo del punto d'inoculazione. . .	873
			Sangue.	—
			Milza.	362
			Fegato	59
			Rene	12
			Midolla delle ossa	15
			Gangli linfatici sottocutanei a distanza	1381
			Gangli linfatici mesenterici.	943
Cavia . .	1/500 di coltura di 24 ore in grosso tubo d'agar a becco di flauto.	3 giorni	Cellulare sottocutaneo del punto d'inoculazione. . .	152
			Sangue.	—
			Milza	212
			Fegato.	15
			Rene.	11
			Midolla delle ossa.	16
			Gangli linfatici sottocutanei a distanza.	∞
			Gangli linfatici mesenterici .	2125
Cavia . .	1/500 di coltura di 24 ore in grosso tubo d'agar a becco di flauto.	3 giorni	Cellulare sottocutaneo del punto d'inoculazione. . .	183
			Sangue.	—
			Milza	97
			Fegato	4
			Rene	9
			Midolla delle ossa	7
			Gangli linfatici sottocutanei a distanza.	∞
			Gangli linfatici mesenterici .	2090

Segue TABELLA IV — *Esperienze con il bacillo del tifo.*

Animali da esperimento	Quantità di coltura inoculata	Tempo dopo il quale si uccideva l'animale	Numero delle colonie di bacillo del tifo rinvenute nei principali organi e tessuti dell'economia	
Cavia . .	1/500 di coltura in 24 ore in grosso tubo d'agar a becco di flauto.	4 giorni	Cellulare sottocutaneo del punto d'inoculazione. . .	12
			Sangue.	—
			Milza	21
			Fegato.	—
			Rene	1
			Midolla delle ossa	3
			Gangli linfatici sottocutanei a distanza.	1580
			Gangli linfatici mesenterici.	857
Cavia . .	1/500 di coltura di 24 ore in grosso tubo d'agar a becco di flauto.	4 giorni	Cellulare sottocutaneo del punto d'inoculazione. . .	9
			Sangue.	—
			Milza	2
			Fegato.	—
			Rene	5
			Midolla delle ossa	—
			Gangli linfatici sottocutanei a distanza	2009
			Gangli linfatici mesenterici.	913
Cavia . .	1/500 di cultura di 24 ore in grosso tubo d'agar a becco di flauto.	6 giorni	Cellulare sottocutaneo del punto d'inoculazione. . .	—
			Sangue	—
			Milza	—
			Fegato.	2
			Rene	5
			Midolla delle ossa	—
			Gangli linfatici sottocutanei a distanza	873
			Gangli linfatici mesenterici .	551

Segue TABELLA IV — *Esperienze con il bacillo del tifo.*

Animali da esperimento	Quantità di coltura inoculata	Tempo dopo il quale si uccideva l'animale	Numero delle colonie di bacillo del tifo rinvenute nei principali organi e tessuti dell'economia	
Cavia . .	1/500 di coltura di 24 ore in grosso tubo d'agar a becco di flauto.	6 giorni	Cellulare sottocutaneo del punto d'inoculazione. . .	—
			Sangue.	—
			Milza	3
			Fegato	1
			Rene	—
			Midolla delle ossa	—
			Gangli linfatici sottocutanei vicini e a distanza . . .	1012
			Gangli linfatici mesenterici.	759
Cavia . .	1/500 di coltura di 24 ore in grosso tubo d'agar a becco di flauto.	9 giorni	Cellulare sottocutaneo del punto d'inoculazione. . .	—
			Sangue.	—
			Milza	—
			Fegato.	—
			Rene	2
			Midolla delle ossa	—
			Gangli linfatici sottocutanei vicini e a distanza . . .	992
			Gangli linfatici mesenterici.	368
Cavia . .	1/500 di coltura di 24 ore in grosso tubo d'agar a becco di flanto.	9 giorni	Cellulare sottocutaneo del punto d'inoculazione. . .	—
			Sangue	—
			Milza	—
			Fegato.	—
			Rene	—
			Midolla delle ossa	—
			Gangli linfatici sottocutanei vicini e a distanza . . .	1121
			Gangli linfatici mesenterici.	566

Segue TABELLA IV — *Esperienze con il bacillo del tifo.*

Animali da esperimento	Quantità di coltura inoculata	Tempo dopo il quale si uccideva l'animale	Numero delle colonie di bacillo del tifo rinvenute nei principali organi e tessuti dell'economia	
Cavia . .	1/500 di coltura di 24 ore in grosso tubo d'agar a becco di flauto.	15 giorni	Cellulare sottocutaneo del punto d'inoculazione. . .	—
			Sangue.	—
			Milza	—
			Fegato.	—
			Rene	—
			Midolla delle ossa	—
			Gangli linfatici sottocutanei vicini e a distanza . . .	1886
			Gangli linfatici mesenterici.	709
Cavia . .	1/500 di coltura di 24 ore in grosso tubo d'agar a becco di flauto.	15 giorni	Cellulare sottocutaneo del punto d'inoculazione . .	—
			Sangue	—
			Milza	—
			Fegato	—
			Rene	—
			Midolla delle ossa	—
			Gangli linfatici sottocutanei vicini e a distanza . . .	2420
			Gangli linfatici mesenterici .	539
Cavia . .	1/500 di coltura di 24 ore in grosso tubo d'agar a becco di flauto .	20 giorni	Cellulare sottocutaneo del punto d'inoculazione. . .	—
			Sangue	—
			Milza	—
			Fegato.	—
			Rene	—
			Midolla delle ossa	—
			Gangli linfatici sottocutanei vicini e a distanza . . .	1080
			Gangli linfatici mesenterici .	360

Segue TABELLA IV — *Esperienze con il bacillo del tifo.*

Animali da esperimento	Quantità di coltura inoculata	Tempo dopo il quale si uccideva l'animale	Numero delle colonie di bacillo del tifo rinvenute nei principali organi e tessuti dell'economia	
Cavia . .	1/500 di coltura di 24 ore in grosso tubo d'agar a becco di flauto.	20 giorni	Cellulare sottocutaneo del punto d'inoculazione. . .	—
			Sangue.	—
			Milza	—
			Fegato.	—
			Rene	—
			Midolla delle ossa	—
			Gangli linfatici sottocutanei vicini e a distanza . . .	976
			Gangli linfatici mesenterici.	408
Cavia . .	1/500 di coltura di 24 ore in grosso tubo d'agar a becco di flauto.	30 giorni	Cellulare sottocutaneo del punto d'inoculazione. . .	—
			Sangue.	—
			Milza	—
			Fegato.	—
			Rene	—
			Midolla delle ossa	—
			Gangli linfatici sottocutanei vicini e a distanza . . .	123
			Gangli linfatici mesenterici.	59
Cavia . .	1/500 di coltura di 24 ore in grosso tubo d'agar a becco di flauto.	30 giorni	Cellulare sottocutaneo del punto d'inoculazione. . .	—
			Sangue.	—
			Milza	—
			Fegato.	—
			Rene	—
			Midolla delle ossa	—
			Gangli linfatici sottocutanei vicini e a distanza . . .	97
			Gangli mesenterici	62

Segue TABELLA IV — *Esperienze con il bacillo del tifo.*

Animali da esperimento	Quantità di coltura inoculata	Tempo dopo il quale si uccideva l'animale	Numero delle colonie di bacillo del tifo rinvenute nei principali organi e tessuti dell'economia	
Cavia . .	1/500 di coltura di 24 ore in grosso tubo d'agar a becco di flauto.	40 giorni	Cellulare sottocutaneo del punto d'inoculazione . .	—
			Sangue.	—
			Milza	—
			Fegato.	—
			Rene	—
			Midolla delle ossa	—
			Gangli linfatici sottocutanei vicini e a distanza . . .	19
			Gangli linfatici mesenterici.	15
Cavia . .	1/500 di coltura di 24 ore in grosso tubo d'agar a becco di flauto.	40 giorni	Cellulare sottocutaneo del punto d'inoculazione. . .	—
			Sangue.	—
			Milza	—
			Fegato.	—
			Rene	—
			Midolla delle ossa.	—
			Gangli linfatici sottocutanei vicini e a distanza . . .	7
			Gangli linfatici mesenterici .	12
Cavia . .	1/500 di coltura di 24 ore in grosso tubo d'agar a becco di flauto.	60 giorni	Cellulare sottocutaneo del punto d'inoculazione. . .	—
			Sangue.	—
			Milza	—
			Fegato.	—
			Rene	—
			Midolla delle ossa	—
			Gangli linfatici sottocutanei vicini e a distanza . . .	9
			Gangli linfatici mesenterici.	—

C — **Inoculazioni di batteri patogeni in animali poco recettivi.**

TABELLA V — *Esperienze con il bacillo del tifo.*

Animali da esperimento	Quantità di coltura inoculata	Tempo dopo il quale si uccideva l'animale	Numero delle colonie di bacillo del tifo rinvenute nei principali organi e tessuti dell'economia	
Cane . .	3 anse di coltura di 24 ore in agar.	24 ore	Cellulare sottocutaneo del punto d'inoculazione. . .	239
			Sangue.	3
			Milza	41
			Fegato.	13
			Rene	4
			Midolla delle ossa	2
			Gangli linfatici sottocutanei a distanza.	57
			Gangli linfatici mesenterici.	15
Cane . .	3 anse di coltura di 24 ore in agar.	2 giorni	Cellulare sottocutaneo del punto d'inoculazione. . .	197
			Sangue.	—
			Milza	12
			Fegato.	3
			Rene	—
			Midolla delle ossa	—
			Gangli linfatici sottocutanei a distanza.	31
			Gangli linfatici mesenterici.	9
Cane . .	3 anse di coltura di 24 ore in agar.	5 giorni	Cellulare sottocutaneo del punto d'inoculazione. . .	—
			Sangue.	—
			Milza	—
			Fegato.	—
			Rene	—
			Midolla delle ossa	—
			Gangli linfatici sottocutanei a distanza.	112
			Gangli linfatici mesenterici.	6

Segue TABELLA V — *Esperienze con il bacillo del tifo.*

Animali da esperimento	Quantità di coltura inoculata	Tempo dopo il quale si uccideva l'animale	Numero delle colonie di bacillo del tifo rinvenute nei principali organi e tessuti dell'economia	
Cane . .	3 anse di coltura di 24 ore in agar.	10 giorni	Cellulare sottocutaneo del punto d'inoculazione. . .	—
			Sangue.	—
			Milza	—
			Fegato.	—
			Rene	—
			Midolla delle ossa	—
			Gangli linfatici sottocutanei vicini e a distanza . . .	28
			Gangli linfatici mesenterici.	8
Cane . .	3 anse di coltura di 24 ore in agar.	15 giorni	Cellulare sottocutaneo del punto d'inoculazione. . .	—
			Sangue.	—
			Milza	—
			Fegato.	—
			Rene	—
			Midolla delle ossa	—
			Gangli linfatici sottocutanei vicini e a distanza . . .	12
			Gangli linfatici mesenterici.	5
Cane . .	3 anse di coltura di 24 ore in agar.	30 giorni	Cellulare sottocutaneo del punto d'inoculazione. . .	—
			Sangue.	—
			Milza	—
			Fegato.	—
			Rene	—
			Midolla delle ossa	—
			Gangli linfatici sottocutanei vicini e a distanza . . .	4
			Gangli linfatici mesenterici.	—

Segue TABELLA V — *Esperienze con il bacillo del tifo.*

Animali da esperimento	Quantità di coltura inoculata	Tempo dopo il quale si uccideva l'animale	Numero delle colonie di bacillo del tifo rinvenute nei principali organi e tessuti dell'economia	
Cane . .	3 anse di coltura di 24 ore in agar.	40 giorni	Cellulare sottocutaneo del punto d'inoculazione. . .	—
			Sangue.	—
			Milza	—
			Fegato.	—
			Rene	—
			Midolla delle ossa	—
			Gangli linfatici sottocutanei	—
			Gangli linfatici mesenterici.	—

TABELLA VI — *Esperienze con il bacillo del carbonchio.*

Animali da esperimento	Quantità di coltura inoculata	Tempo dopo il quale si uccideva l'animale	Numero delle colonie di bacillo del carbonchio rinvenute nei principali organi e tessuti dell'economia	
Cane . .	1/4 di cc. di coltura di 24 ore in brodo.	24 ore	Cellulare sottocutaneo del punto d'inoculazione. . .	128
			Sangue.	—
			Milza	19
			Fegato.	8
			Rene	1
			Midolla delle ossa	1
			Gangli linfatici sottocutanei a distanza.	37
			Gangli linfatici mesenterici.	11
Cane . .	1/4 di cc. di coltura di 24 ore in brodo.	2 giorni	Cellulare sottocutaneo del punto d'inoculazione. . .	73
			Sangue.	—
			Milza	4
			Fegato.	1
			Rene	—
			Midolla delle ossa	—
			Gangli linfatici sottocutanei a distanza.	29
			Gangli linfatici mesenterici.	12
Cane . .	1/4 di cc. di coltura di 24 ore in brodo.	5 giorni	Cellulare sottocutaneo del punto d'inoculazione. . .	—
			Sangue.	—
			Milza	—
			Fegato.	—
			Rene	—
			Midolla delle ossa	—
			Gangli linfatici sottocutanei a distanza.	32
			Gangli linfatici mesenterici.	10

Segue TABELLA VI — *Esperienze con il bacillo del carbonchio.*

Animali da esperimento	Quantità di coltura inoculata	Tempo dopo il quale si uccideva l'animale	Numero delle colonie di bacillo del carbonchio rinvenute nei principali organi e tessuti dell'economia	
Cane . .	1/4 di cc. di coltura di 24 ore in brodo.	10 giorni	Cellulare sottocutaneo del punto d'inoculazione. . .	—
			Sangue.	—
			Milza	—
			Fegato.	—
			Rene	—
			Midolla delle ossa	—
			Gangli linfatici sottocutanei a distanza e vicini . . .	15
			Gangli linfatici mesenterici.	6
Cane . .	1/4 di cc. di coltura di 24 ore in brodo.	15 giorni	Cellulare sottocutaneo del punto d'inoculazione. . .	—
			Sangue.	—
			Milza	—
			Fegato.	—
			Rene	—
			Midolla delle ossa	—
			Gangli linfatici sottocutanei vicini e a distanza . . .	7
			Gangli linfatici mesenterici.	2
Cane . .	1/4 di cc. di coltura di 24 ore in brodo.	25 giorni	Cellulare sottocutaneo del punto d'inoculazione. . .	—
			Sangue.	—
			Milza	—
			Fegato.	—
			Rene	—
			Midolla delle ossa	—
			Gangli linfatici sottocutanei vicini e a distanza . . .	2
			Gangli linfatici mesenterici.	—

Segue TABELLA VI — *Esperienze con il bacillo del carbonchio.*

Animali da esperimento	Quantità di coltura inoculata	Tempo dopo il quale si uccideva l'animale	Numero delle colonie di bacillo del carbonchio rinvenute nei principali organi e tessuti dell'economia	
Cane . .	1/4 di cc. di coltura di 24 ore in brodo.	40 giorni	Cellulare sottocutaneo del punto d'inoculazione. . .	—
			Sangue.	—
			Milza	—
			Fegato	—
			Rene	—
			Midolla delle ossa	—
			Gangli linfatici sottocutanei vicini e a distanza . . .	—
			Gangli linfatici mesenterici.	—

Dalle esperienze suesposte risulta che i batteri, siano o non patogeni, penetrati in dose non letale nell'organismo, ben presto, trovandosi l'animale in buone condizioni di resistenza, scompaiono dal punto di inoculazione: dopo 3-4 giorni circa i batteri saprofiti, dopo 5-6 giorni i patogeni. Nel sangue i detti germi si riscontrano solo nelle prime 24 ore dall' inoculazione; in seguito scompaiono dal torrente circolatorio, ma vengono in gran parte trattenuti dai vari organi, in parte eliminati dall'organismo. Però anche fin dalle prime ore dopo l'inoculazione il sistema ganglionare linfatico è quello che rinserra il più grande numero di batteri.

Più tardi, man mano che l'animale si rimette dai disturbi arrecati dall'inoculazione, i microrganismi vengono ad essere distrutti o eliminati completamente dai vari organi dell'economia, ed è solo nei gangli linfatici che essi possono conservarsi vitali per un tempo assai lungo, e talvolta anche moltiplicarsi. Anche quivi però tali batteri sono a poco a poco distrutti, e dopo un certo tempo finiscono con lo scomparire.

La scomparsa totale dei detti germi dall'organismo avviene più presto per i batteri saprofiti poco resistenti, e sprovvisti di spore, come il *batterio prodigioso*, più tardi per i batteri sporigeni, quali il *mesentericus fuscus*.

I batteri patogeni, inoculati negli animali molto recettivi, soggiornano per un tempo abbastanza lungo nei gangli linfatici, ed in numero

notevole, specialmente i bacilli del tifo. Nell'organismo degli animali poco sensibili i microbi scompaiono dal punto d'inoculazione alquanto più presto che negli animali recettivi, come pure più breve è il loro soggiorno nei gangli linfatici. Il numero delle colonie inoltre che si ricava da questi ultimi è sempre inferiore a quello riscontrato nei gangli linfatici degli animali molto recettivi.

Tale fatto è con molta probabilità dovuto al potere fagocitico più energico, che posseggono gli elementi cellulari degli animali refrattari, per cui da una parte avverrebbe una più rapida distruzione dei batteri nel punto d'inoculazione (come è del resto dimostrato dell'essere la quantità delle colonie ricavate dal cellulare sottocutaneo, corrispondente al punto d'inoculazione, più scarsa negli animali poco recettivi, anzichè in quelli molto recettivi), e conseguentemente meno abbondante sarebbe il numero dei germi che arrivano ai gangli linfatici; dall'altra parte poi nelle glandole linfatiche stesse la distruzione dei batteri da parte di quei pochi fagociti ivi esistenti avverrebbe anche più rapidamente di quel che avviene negli animali recettivi.

Un altro fatto importante che si è osservato nelle sopradette esperienze riguarda la maniera di comportarsi dei microbi, che normalmente esistono nei gangli linfatici, di fronte ai batteri, che vengono ad essere inoculati in grande quantità nell'organismo animale.

Si è infatti constatato che quando nei gangli linfatici si rinvengono in numero molto sparuto i batteri inoculati, questi si trovano sempre commisti a colonie dei comuni batteri, già normalmente rinvenuti nelle glandole linfatiche; quando però il numero dei germi inoculati che dalle medesime si ottengono è notevole, allora non si constata nessuna colonia di quei microrganismi trovati ordinariamente nei gangli.

È da ammettersi quindi che quei pochi batteri, i quali normalmente esistono nelle glandole linfatiche, vengano ad essere sopraffatti dai batteri, che in grande quantità invadono l'organismo.

II.

Modificazioni subite dai batteri patogeni nel passaggio attraverso il sistema ganglionare linfatico degli animali.

L'unica modificazione importante che i microrganismi patogeni subiscono nei passaggi successivi attraverso i gangli linfatici degli animali, siano o non recettivi, riguarda la loro virulenza. Le esperienze per assodare tale fatto sono state praticate sopra microrganismi diversi,

quali lo *pneumococco*, il *bacillo del tifo*, lo *stafilococco piogeno aureo*, il *bacillo del carbonchio*, il *bacillo della peste bubonica*, il *bacillo della tubercolosi*. Esporrò dettagliatamente i risultati ottenuti per ciascuno dei detti microrganismi.

Debbo tuttavia premettere che nell'esportazione dei gangli linfatici si è avuto cura di scegliere i gangli posti ad una certa distanza dal punto d'inoculazione (gli animali sono stati inoculati sempre nel sottocutaneo della coscia o del fianco) e si sono presi i gangli sopra e sotto ioidei, i carotidei, ed i mesenterici, per evitare che i microrganismi, infiltrati nei tessuti corrispondenti al punto d'inoculazione, potessero aderire alla superficie dei gangli vicini, e svilupparsi nelle colture, unitamente ai germi esistenti nel parenchima glandolare. Per assicurarmi poi che dopo i soliti lavaggi ripetuti nessun microrganismo restava aderente alla superficie dei gangli, ho immerso questi ultimi integri in piastre con agar non completamente solidificate. Dopo 12–24 ore alla superficie di essi non si è rinvenuta alcuna colonia di germi.

Nelle esperienze che verrò ad esporre le ricerche sono state in principio eseguite con i gangli sottocutanei e con i gangli mesenterici, però avendo osservato che i risultati ottenuti sì dagli uni che dagli altri erano uguali, mi sono servito tanto dei gangli sottocutanei quanto dei gangli mesenterici, facendone un'unica emulsione, e prelevando poi da questa il materiale batterifero.

a) Pneumococco.

Si è sperimentato con coltura in brodo di pneumococco, una goccia della quale, inoculata nel cellulare sottocutaneo, uccideva un coniglio di 1500-2000 gr. in 36 ore circa.

Appena morto l'animale si asportavano con la solita tecnica i gangli linfatici; di essi alcuni venivano, dopo numerosi lavaggi, spappolati, per insemensare con un'ansa di tale poltiglia del brodo comune di coltura; i rimanenti gangli si distribuivano in provette separate, contenenti del cloruro sodico in soluzione fisiologica, e si collocavano nell'incubatrice a 37° C. Dopo 1, 2, 3 e più giorni di dimora alla stufa, si praticavano dai detti gangli altri innesti in brodo, allo scopo di vedere se lo pneumococco, con un prolungato soggiorno nel parenchima glandolare fuori dell'organismo, subisse delle modificazioni.

Lo stesso si è praticato, a titolo di controllo, dalla milza: questa veniva divisa in vari pezzetti, da uno dei quali si faceva un innesto in brodo subito dopo la morte dell'animale; dagli altri frammenti gl'innesti venivano prelevati 24, 48 e più ore di soggiorno nell' incubatrice.

La milza in tali esperienze è stata, come si è detto, scelta a titolo di controllo, perchè si sa che lo pneumococco, come del resto tutti gli altri microbi, nei consecutivi passaggi attraverso l'organismo di animali recettivi, non diminuiscono di virulenza.

Or è da notarsi che, conservando in tal guisa, fuori dall'organismo, la milza ed i gangli linfatici di animali morti per infezione pneumonica, lo pneumococco si conserva nei gangli linfatici più a lungo che nella milza; ed infatti, mentre gl' innesti che si praticano dai gangli linfatici, tenuti per 5 giorni alla stufa, sono ancora fertili, quelli fatti dalla milza mantenuta più di 48 ore nella stufa a 37° C, riescono quasi sempre sterili.

E tale fatto ha molta analogia con ciò che si osserva nelle ordinarie colture in brodo, nelle quali lo pneumococco dopo 2-3 giorni muore, ed il brodo riacquista la primitiva limpidezza.

Un'altra particolarità degna di nota, la quale è stata anche constatata nelle esperienze eseguite con gli altri microrganismi, di cui parlerò in seguito, è che gl' innesti fatti dai gangli linfatici degli animali infetti, anche dopo 4-5 giorni di dimora alla stufa, hanno dato sempre luogo a sviluppo di quei soli microrganismi che determinarono l' infezione. Gl' innesti poi praticati dai detti organi dopo un soggiorno prolungato nella incubatrice (in media dopo il sesto giorno) non hanno dato luogo a sviluppo di alcuna specie di microrganismi.

Tale osservazione, costantemente ripetuta, conferma il fatto già accennato nel capitolo precedente, che cioè in seguito ad una infezione grave, i germi, che normalmente esistono nei gangli, vengono ad essere distrutti dal gran numero di batteri patogeni che determinano l' infezione.

Vengo ora ad accennare alle esperienze eseguite con il diplococco di Fraenkel in ordine alla virulenza.

TABELLA VII — *Esperienze eseguite con il diplococco di Fraenkel.*

Animali inoculati	Data dell'inoculazione	Animali dai quali si è preso il materiale per l'inoculazione	Qualità del materiale inoculato	Numero dei passaggi attraverso i gangli linfatici	Quantità della coltura inoculata	Esito della inoculazione
Coniglio 1°.	15 dicem. 1896	Da un coniglio inoculato con coltura virulenta, e morto dopo 36 ore.	Coltura di 24 ore ottenuta dal *sangue*.		3 goccie normali.	+ dopo 24 ore
Coniglio 2°.	Id.	Id.	Coltura di 24 ore ottenuta dalla *milza* presa *subito dopo* la morte dell'animale.		Id.	Id.
Coniglio 3°.	Id.	Id.	Coltura di 24 ore ottenuta dai *gangli*, presi *subito dopo* la morte.	1° pass.	Id.	+ dopo 2 giorni
Coniglio 4°.	17 dicem. 1896	Id.	Coltura di 24 ore ottenuta dai *gangli*, tenuti 2 *giorni* a 37° C.	Id.	Id.	Id.
Coniglio 5°.	18 dicem. 1896	Id.	Coltura di 24 ore ottenuta dai *gangli*, tenuti *3 giorni* a 37° C.	Id.	Id.	Id.
Coniglio 6°.	Id.	Id.	Coltura di 24 ore ottenuta dalla *milza*, tenuta *3 giorni* a 37° C.		Id.	Id.
Coniglio 7°.	18 dicem. 1896	Dal coniglio 3°.	Coltura di 24 ore ottenuta dal *sangue*.		3 goccie normali.	+ dopo 2 giorni

Segue TABELLA VII — *Esperienze eseguite con il diplococco di Fraenkel.*

Animali inoculati	Data dell'inoculazione	Animali dai quali si è preso il materiale per l'inoculazione	Qualità del materiale inoculato	Numero dei passaggi attraverso i gangli linfatici	Quantità della coltura inoculata	Esito della inoculazione
Coniglio 8°	18 dicem. 1896	Dal coniglio 3°	Coltura di 24 ore ottenuta dalla *milza*, presa *subito dopo* la morte		3 gocce normali	+ dopo 2 giorni
Coniglio 9°	Id.	Id.	Coltura di 24 ore ottenuta dai *gangli*, presi *subito dopo* la morte.	2° pass.	Id.	Vive
Coniglio 10°	21 dicem. 1896	Id.	Coltura di 24 ore ottenuta dai *gangli*, tenuti *4 giorni* a 37° C.	Id.	Id.	Id.
Coniglio 11°	21 dicem. 1896	Id.	Coltura di 24 ore ottenuta dalla *milza*, tenuta *3 giorni* a 37° C.		Id.	+ dopo 2 giorni
Coniglio 12°	21 dicem. 1896	Dal coniglio 6°	Coltura di 24 ore dal *sangue*.		3 gocce normali	+ dopo 36 ore
Coniglio 13°	Id.	Id.	Coltura di 24 ore ottenuta dalla *milza*, presa *subito dopo* la morte.		Id.	Id.
Coniglio 14°	Id.	Id.	Coltura di 24 ore dai *gangli*, presi *subito dopo* la morte.	1° pass.	Id.	+ dopo 2 giorni

Segue TABELLA VII — *Esperienze eseguite con il diplococco di Fraenkel.*

Animali inoculati	Data dell'inoculazione	Animali dai quali si è preso il materiale per l'inoculazione	Qualità del materiale inoculato	Numero dei passaggi attraverso i gangli linfatici	Quantità della coltura inoculata	Esito della inoculazione
Coniglio 15°	21 dicem. 1896	Dal coniglio 5°	Coltura di 24 ore dal *sangue.*		3 gocce normali	+ dopo 2 giorni
Coniglio 16°	Id.	Id.	Coltura di 24 ore dalla *milza,* presa *subito dopo* la morte.		Id.	+ dopo 36 ore
Coniglio 17°	Id.	Id.	Coltura di 24 ore dai *gangli,* presi *qualche ora dopo* la morte.	2° pass.	Id.	Resta in vita, ma è ucciso 10 giorni dopo l'inoculazione.
Coniglio 18°	Id.	Id.	Coltura di 24 ore dalla *milza,* tenuta 2 *giorni* a 37° C.		Id.	+ dopo 2 giorni
Coniglio 19°	23 dicem. 1896	Da un coniglio inoculato con coltura virulenta, e morto dopo 36 ore.	Coltura di 24 ore dal *sangue.*		3 gocce normali	+ dopo 20 ore
Coniglio 20°	Id.	Id.	Coltura di 24 ore dalla *milza,* presa *subito dopo* la morte.		Id.	+ dopo 24 ore
Coniglio 21°	Id.	Id.	Coltura di 24 ore dai *gangli,* presi *subito dopo* la morte.	1° pass.	Id.	+ dopo 36 ore
Coniglio 22°	25 dicem. 1896	Id.	Coltura di 24 ore dai *gangli,* tenuti 2 *giorni* a 37° C.	Id.	Id.	+ dopo 2 giorni

Segue TABELLA VII — *Esperienze eseguite con il diplococco di Fraenkel.*

Animali inoculati	Data dell'inoculazione	Animali dai quali si è preso il materiale per l'inoculazione	Qualità del materiale inoculato	Numero dei passaggi attraverso i gangli linfatici	Quantità della coltura inoculata	Esito della inoculazione
Coniglio 23°	26 dicem. 1896	Da un coniglio inoculato con coltura virulenta, e morto dopo 36 ore.	Coltura di 24 ore dai *gangli*, tenuti *3 giorni* a 37° C.	1° pass.	3 gocce normali	+ dopo 2 giorni
Coniglio 24°	27 dicem. 1896	Id.	Coltura di 24 ore dai *gangli*, tenuti *4 giorni* a 37° C.	Id.	Id.	Id.
Coniglio 25°	25 dicem. 1896	Id.	Coltura di 24 ore dalla *milza*, tenuta *2 giorni* a 37° C.		Id.	+ dopo 36 ore
Coniglio 26°	28 dicem. 1896	Dal coniglio 25°	Coltura di 24 ore dal *sangue*.		3 gocce normali	+ dopo 36 ore
Coniglio 27°	Id.	Id.	Coltura di 24 ore dalla *milza*. presa *subito dopo* la morte.		Id.	Id.
Coniglio 28°	Id.	Id.	Coltura di 24 ore dai *gangli*, presi *subito dopo* la morte.	1° pass.	Id.	Id.
Coniglio 29°	31 dicem. 1896	Id.	Coltura di 24 ore dai *gangli*, tenuti *3 giorni* a 37° C.	Id.	Id.	+ dopo 2 giorni
Coniglio 30°	30 dicem. 1896	Id.	Coltura di 24 ore dalla *milza*, tenuta *2 giorni* a 37° C.		Id.	+ dopo 36 ore

Segue TABELLA VII — *Esperienze eseguite con il diplococco di Fraenkel.*

Animali inoculati	Data dell'inoculazione	Animali dai quali si è preso il materiale per l'inoculazione	Qualità del materiale inoculato	Numero dei passaggi attraverso i gangli linfatici	Quantità della coltura inoculata	Esito della inoculazione
Coniglio 31°	31 dicem. 1896	Dal Coniglio 28°	Coltura di 24 ore dal *sangue*.		3 gocce normali	+ dopo 36 ore
Coniglio 32°	Id.	Id.	Coltura di 24 ore dalla *milza* presa *subito dopo* la morte.		Id.	Id.
Coniglio 33°	Id.	Id.	Coltura di 24 ore dai *gangli*, presi *6 ore dopo* la morte.	2° pass.	Id.	Vive
Coniglio 34°	2 genn. 1897	Id.	Coltura di 24 ore dalla *milza*, tenuta 2 *giorni* a 37° C.		Id.	+ dopo 36 ore
Coniglio 35°	31 dicem. 1896	Dal Coniglio 24°	Coltura di 24 ore dalla *milza*, presa *12 ore dopo* la morte		3 gocce normali	+ dopo 36 ore
Coniglio 36°	Id.	Id.	Coltura di 24 ore dai *gangli*, presi *12 ore dopo* la morte.	2° pass.	Id.	+ dopo 2 giorni
Coniglio 37°	3 genn. 1897	Id.	Coltura di 24 ore dai *gangli*, tenuti *3 giorni* a 37° C.	Id.	Id.	+ dopo 4 giorni
Coniglio 38°	5 genn. 1897	Id.	Coltura di 24 ore dai *gangli*, tenuti *5 giorni* a 37° C.	Id	Id.	Id.
Coniglio 39°	2 genn. 1897	Id.	Coltura di 24 ore dalla *milza*, tenuta 2 *giorni* a 37° C.		Id.	+ dopo 36 ore

Segue TABELLA VII — *Esperienze eseguite con il diplococco di Fraenkel.*

Animali inoculati	Data dell'inoculazione	Animali dai quali si è preso il materiale per l'inoculazione	Qualità del materiale inoculato	Numero dei passaggi attraverso i gangli linfatici	Quantità della coltura inoculata	Esito della inoculazione
Coniglio 40°	2 genn. 1897	Dal coniglio 36°	Coltura di 24 ore dalla *milza*, presa *subito dopo* la morte.		3 gocce normali	+ dopo 36 ore
Coniglio 41°	Id.	Id.	Coltura di 24 ore dai *gangli*, presi *subito dopo* la morte.	3° pass.	Id.	+ dopo 2 giorni
Coniglio 42°	6 genn. 1897	Id.	Coltura di 24 ore dai *gangli*, tenuti *3 giorni* a 37° C.	Id.	Id.	Vive
Coniglio 43°	5 genn. 1897	Id.	Coltura di 24 ore dalla *milza*, tenuta *2 giorni* a 37° C.		Id.	+ dopo 40 ore
Coniglio 44°	6 genn. 1897	Dal coniglio 40°	Coltura di 24 ore dal *sangue*.		3 gocce normali	+ dopo 18 ore
Coniglio 45°	Id.	Id.	Coltura di 24 ore dalla *milza*, presa *subito dopo* la morte.		Id.	+ dopo 24 ore
Coniglio 46°	Id.	Id.	Coltura di 24 ore dai *gangli*, presi *subito dopo* la morte.	1° pass.	Id.	+ dopo 2 giorni
Coniglio 47°	9 genn. 1897	Id.	Coltura di 24 ore dai *gangli*, tenuti *3 giorni* a 37° C.	Id.	Id.	+ dopo 60 ore
Coniglio 48°	Id.	Id.	Coltura di 24 ore dalla *milza*, tenuta *3 giorni* a 37° C		Id.	+ dopo 2 giorni

Segue TABELLA VII — *Esperienze eseguite con il diplococco di Fraenkel.*

Animali inoculati	Data dell'inoculazione	Animali dai quali si è preso il materiale per l'inoculazione	Qualità del materiale inoculato	Numero dei passaggi attraverso i gangli linfatici	Quantità della coltura inoculata	Esito della inoculazione
Coniglio 49°	9 genn. 1897	Dal coniglio 46°	Coltura di 24 ore dalla *milza*, presa *subito dopo* la morte.		3 gocce normali	+ dopo 36 ore
Coniglio 50°	Id.	Id.	Coltura di 24 ore dai *gangli*, presi *subito dopo* la morte.	2° pass.	Id.	+ dopo 6 giorni
Coniglio 51°	12 genn. 1897	Id.	Coltura di 24 ore dai *gangli*, tenuti *3 giorni* a 37° C.	Id.	Id.	+ dopo 4 giorni
Coniglio 52°	11 genn. 1897	Id.	Coltura di 24 ore dalla *milza*, tenuta 2 *giorni* a 37° C.		Id.	+ dopo 60 ore
Coniglio 53°	10 genn. 1897	Dal coniglio 38°	Coltura di 24 ore dal *sangue*.		3 gocce normali	+ dopo 36 ore
Coniglio 54°	Id.	Id.	Coltura di 24 ore dalla *milza*, presa *subito dopo* la morte		Id.	Id.
Coniglio 55°	Id.	Id.	Coltura di 24 ore dai *gangli*, presi *subito dopo* la morte.	3° pass.	Id.	Vive
Coniglio 56°	13 genn. 1897	Id.	Coltura di 24 ore dai *gangli*, tenuti *3 giorni* a 37° C.	Id.	Id.	Vive
Coniglio 57°	12 genn. 1897	Id.	Coltura di 24 ore dalla *milza*, tenuta 2 *giorni* a 37° C.		Id.	+ dopo 3 giorni

Segue TABELLA VII — *Esperienze eseguite con il diplococco di Fraenkel.*

Animali inoculati	Data dell'inoculazione	Animali dai quali si è preso il materiale per l'inoculazione	Qualità del materiale inoculato	Numero dei passaggi attraverso i gangli linfatici	Quantità della coltura inoculata	Esito della inoculazione
Coniglio 58°	13 genn. 1897	Dal coniglio 47°	Coltura di 24 ore dalla *milza*, presa *alcune ore dopo* la morte.		3 gocce normali	+ dopo 36 ore
Coniglio 59°	Id.	Id.	Coltura di 24 ore dai *gangli*, presi *alcune ore dopo* la morte.	2° pass.	Id.	Vive
Coniglio 60°	16 genn. 1897	Id.	Coltura di 24 ore dai *gangli*, tenuti *3 giorni* a 37° C.	Id.	Id.	Resta in vita, ma è ucciso 6 giorni dopo la inoculazione
Coniglio 61°	Id.	Id.	Coltura di 24 ore dalla *milza*, tenuta *3* giorni a 37° C.		Id.	+ dopo 3 giorni
Coniglio 62°	16 genn. 1897	Dal coniglio 58°	Coltura di 24 ore dalla *milza*, presa *subito dopo* la morte.		3 gocce normali	+ dopo 36 ore.
Coniglio 63°	Id.	Id.	Coltura di 24 ore dai *gangli*, presi *subito dopo* la morte.	1° pass.	Id.	+ dopo 2 giorni
Coniglio 64°	18 genn. 1897	Id.	Coltura di 24 ore dai *gangli*, tenuti *2 giorni* a 37° C.	Id.	Id.	+ dopo 3 giorni
Coniglio 65°	21 genn. 1897	Id.	Coltura di 24 ore dai *gangli*, tenuti *5 giorni* a 37° C.	Id.	Id.	+ dopo 2 giorni
Coniglio 66°	21 genn. 1897	Id.	Coltura di 24 ore dalla *milza*, tenuta *3 giorni* a 37° C.		Id.	+ dopo 36 ore

Segue TABELLA VII — *Esperienze eseguite con il diplococco di Fraenkel.*

Animali inoculati	Data dell'inoculazione	Animali dai quali si è preso il materiale per l'inoculazione	Qualità del materiale inoculato	Numero dei passaggi attraverso i gangli linfatici	Quantità della coltura inoculata	Esito della inoculazione
Coniglio 67°	19 genn. 1897	Dal coniglio 63°	Coltura di 24 ore dalla *milza*, presa *subito dopo* la morte.		3 gocce normali	+ dopo 36 ore
Coniglio 68°	Id.	Id.	Coltura di 24 ore dai *gangli*, presi *subito dopo* la morte.	2° pass.	Id.	+ dopo 2 giorni
Coniglio 69°	23 genn. 1897	Id.	Coltura di 24 ore dai *gangli*, tenuti *4 giorni* a 37° C.	Id.	Id.	Id.
Coniglio 70°	21 genn. 1897	Id.	Coltura di 24 ore dalla *milza*, tenuta 2 *giorni* a 37° C.		Id.	Id.
Coniglio 71°	24 genn. 1897	Dal coniglio 65°	Coltura di 24 ore dalla *milza*, presa *qualche ora dopo* la morte.		3 gocce normali	+ dopo 36 ore
Coniglio 72°	Id.	Id.	Coltura di 24 ore dai *gangli*, presi *qualche ora dopo* la morte.	2° pass.	Id.	+ dopo 2 giorni
Coniglio 73°	29 genn. 1897	Id.	Coltura di 24 ore dai *gangli*, tenuti *5 giorni* a 37° C.	Id.	Id.	Id.
Coniglio 74°	26 genn. 1897	Id.	Coltura di 24 ore dalla *milza*, tenuta 2 *giorni* a 37° C.		Id.	+ dopo 36 ore

Segue TABELLA VII *Esperienze eseguite con il diplococco di Fraenkel.*

Animali inoculati	Data dell'inoculazione	Animali dai quali si è preso il materiale per l'inoculazione	Qualità del materiale inoculato	Numero dei passaggi attraverso i gangli linfatici	Quantità della coltura inoculata	Esito della inoculazione
Coniglio 75°	1 febbr. 1897	Dal coniglio 73°	Coltura di 24 ore dalla *milza*, presa *qualche ora dopo* la morte.		3 gocce normali	+ dopo 36 ore
Coniglio 76°	Id.	Id.	Coltura di 24 ore dai *gangli*, presi *qualche ora dopo* la morte.	3° pass.	Id.	+ dopo 2 giorni
Coniglio 77°	4 febbr. 1897	Id.	Coltura di 24 ore dai *gangli*, tenuti *3 giorni* a 37° C.	Id.	Id.	+ dopo 60 ore
Coniglio 78°	3 febbr. 1897	Id.	Coltura di 24 ore dalla *milza*, tenuta *2 giorni* a 37° C.		Id.	+ dopo 2 giorni
Coniglio 79°	8 febbr. 1897	Dal coniglio 77°	Coltura di 24 ore dalla *milza*, presa *alcune ore dopo* la morte.		3 gocce normali	+ dopo 36 ore
Coniglio 80°	Id.	Id.	Coltura di 24 ore dai *gangli*, presi *alcune ore dopo* la morte.	4° pass.	Id.	+ dopo 2 giorni
Coniglio 81°	11 febbr. 1897	Id.	Coltura di 24 ore dai *gangli*, tenuti *3 giorni* a 37° C.	Id.	Id.	Id.
Coniglio 82°	10 febbr. 1897	Id.	Coltura di 24 ore dalla *milza*, tenuta *2 giorni* a 37° C.		Id.	+ dopo 36 ore

Segue TABELLA VII — *Esperienze eseguite con il diplococco di Fraenkel.*

Animali inoculati	Data dell'inoculazione	Animali dai quali si è preso il materiale per l'inoculazione	Qualità del materiale inoculato	Numero dei passaggi attraverso i gangli linfatici	Quantità della coltura inoculata	Esito della inoculazione
Coniglio 83°	14 febbr. 1897	Dal coniglio 81°	Coltura di 24 ore dalla *milza*, presa *subito dopo* la morte.		3 gocce normali	+ dopo 2 giorni
Coniglio 84°	Id.	Id.	Coltura di 24 ore dai *gangli*, presi *subito dopo* la morte.	5° pass.	Id.	Id.
Coniglio 85°	16 febbr. 1897	Id.	Coltura di 24 ore dai *gangli*, tenuti 2 *giorni* a 37° C.	Id.	Id.	+ dopo 60 ore
Coniglio 86°	17 febbr. 1897	Id.	Coltura di 24 ore dai *gangli*, tenuti *3 giorni* a 37° C.	Id.	Id.	+ dopo 3 giorni
Coniglio 87°	16 febbr. 1897	Id.	Coltura di 24 ore dalla *milza*, tenuta 2 *giorni* a 37° C.		Id.	+ dopo 2 giorni
Coniglio 88°	17 febbr. 1897	Dal coniglio 83°	Coltura di 24 ore dalla *milza*, presa *subito dopo* la morte.		3 gocce normali	+ dopo 36 ore
Coniglio 89°	Id.	Id.	Coltura di 24 ore dai *gangli*, presi *subito dopo* la morte.	1° pass.	Id.	+ dopo 2 giorni
Coniglio 90°	20 febbr. 1897	Id.	Coltura di 24 ore dai *gangli*, tenuti *3 giorni* a 37° C.	Id.	Id.	+ dopo 60 ore
Coniglio 91°	19 febbr. 1897	Id.	Coltura di 24 ore dalla *milza*, tenuta 2 *giorni* a 37° C.		Id.	+ dopo 36 ore

Segue TABELLA VII — *Esperienze eseguite con il diplococco di Fraenkel.*

Animali inoculati	Data dell'inoculazione	Animali dai quali si è preso il materiale per l'inoculazione	Qualità del materiale inoculato	Numero dei passaggi attraverso i gangli linfatici	Quantità della coltura inoculata	Esito della inoculazione
Coniglio 92°	17 febbr. 1897	Dal coniglio 89°	Coltura di 24 ore dalla *milza*, presa *subito dopo* la morte.		3 gocce normali	+ dopo 36 ore
Coniglio 93°	Id.	Id.	Coltura di 24 ore dai *gangli*, presi *subito dopo* la morte.	2° pass.	Id.	+ dopo 3 giorni
Coniglio 94°	22 febbr. 1897	Id.	Coltura di 24 ore dai *gangli*, tenuti 2 *giorni* a 37° C.	Id.	Id.	+ dopo 4 giorni
Coniglio 95°	Id.	Id.	Coltura di 24 ore dalla *milza*, tenuta 2 *giorni* a 37° C.		Id.	+ dopo 36 ore
Coniglio 96°	21 febbr. 1897	Dal coniglio 86°	Coltura di 24 ore dalla *milza*, presa *qualche ora dopo* la morte.		3 gocce normali	+ dopo 36 ore
Coniglio 97°	Id.	Id.	Coltura di 24 ore dai *gangli*, presi *qualche ora dopo* la morte.	6° pass.	Id.	+ dopo 4 giorni
Coniglio 98°	24 febbr. 1897	Id.	Coltura di 24 ore dai *gangli*, tenuti 3 *giorni* a 37° C.	Id.	Id.	+ dopo 5 giorni
Coniglio 99°	23 febbr. 1897	Id.	Coltura di 24 ore dalla *milza*, tenuta 2 *giorni* a 37° C.		Id.	+ dopo 36 ore

Segue Tabella VII — *Esperienze eseguite con il diplococco di Fraenkel.*

Animali inoculati	Data dell'inoculazione	Animali dai quali si è preso il materiale per l'inoculazione	Qualità del materiale inoculato	Numero dei passaggi attraverso i gangli linfatici	Quantità della coltura inoculata	Esito della inoculazione
Coniglio 100°	24 febbr. 1897	Dal coniglio 93°	Coltura di 24 ore dalla *milza*, presa *subito dopo* la morte.		3 gocce normali	+ dopo 2 giorni
Coniglio 101°	Id.	Id.	Coltura di 24 ore dai *gangli*, presi *subito dopo* la morte.	3° pass.	Id.	+ dopo 12 giorni
Coniglio 102°	26 febbr. 1897	Id.	Coltura di 24 ore dai *gangli*, tenuti 2 *giorni* a 37° C.	Id.	Id.	+ dopo 15 giorni
Coniglio 103°	Id.	Id.	Coltura di 24 ore dalla *milza*, tenuta 2 *giorni* a 37° C.		Id.	+ dopo 8 giorni
Coniglio 104°	2 marzo 1897	Dal coniglio 98°	Coltura di 24 ore dalla *milza*, presa *alcune ore dopo* la morte.		3 gocce normali	+ dopo 60 ore
Coniglio 105°	Id.	Id.	Coltura di 24 ore dai *gangli*, presi *alcune ore dopo* la morte.	7° pass.	Id.	Vive
Coniglio 106°	9 marzo 1897	Dal coniglio 101°	Coltura di 24 ore dalla *milza*, presa *6 ore dopo* la morte.		3 gocce normali	+ dopo 5 giorni
Coniglio 107°	Id.	Id.	Coltura di 24 ore dai *gangli*, presi *6 ore dopo* la morte.	4° pass.	Id.	Vive

Segue TABELLA VII — *Esperienze eseguite con il diplococco di Fraenkel.*

Animali inoculati	Data dell'inoculazione	Animali dai quali si è preso il materiale per l'inoculazione	Qualità del materiale inoculato	Numero dei passaggi attraverso i gangli linfatici	Quantità della coltura inoculata	Esito della inoculazione
Coniglio 108°	15 marzo 1897	Dal coniglio 102°	Coltura di 48 ore dalla *milza*, presa *subito dopo* la morte.		3 gocce normali	+ dopo 4 giorni
Coniglio 109°	Id.	Id.	Caltura di 48 ore dai *gangli*, presi *subito dopo* la morte.	4° pass.	Id.	Resta in vita, ma è ucciso 15 giorni dopo l'inoculazione
Coniglio 110°	20 marzo 1897	Dal coniglio 108°	Coltura di 24 ore dalla *milza*, presa *subito dopo* la morte.		3 gocce normali	+ dopo 2 giorni
Coniglio 111°	Id.	Id.	Coltura di 24 ore dai *gangli*, presi *subito dopo* la morte.	1° pass	Id.	+ dopo 4 giorni
Coniglio 112°	23 marzo 1897	Id.	Coltura di 24 ore dai *gangli*, tenuti *3 giorni* a 37° C.	Id.	Id.	Id.
Coniglio 113°	22 marzo 1897	Id.	Coltura di 24 ore dalla *milza*, tenuta *2 giorni* a 37° C.		Id.	+ dopo 3 giorni
Coniglio 114°	25 marzo 1897	Dal coniglio 111°	Coltura di 24 ore dalla *milza*, presa *qualche ora dopo* la morte.		3 gocce normali	+ dopo 2 giorni
Coniglio 115°	Id.	Id.	Coltura di 24 ore dai *gangli*, presi *qualche ora dopo* la morte.	2° pass.	Id.	+ dopo 4 giorni

Segue TABELLA VII — *Esperienze eseguite con il diplococco di Fraenkel.*

Animali inoculati	Data dell'inoculazione	Animali dai quali si è preso il materiale per l'inoculazione	Qualità del materiale inoculato	Numero dei passaggi attraverso i gangli linfatici	Quantità della coltura inoculata	Esito della inoculazione
Coniglio 116°	27 marzo 1897	Dal coniglio 111°	Coltura di 24 ore dai *gangli*, tenuti 2 *giorni* a 37° C.	2° pass.	3 gocce normali	+ dopo 4 giorni
Coniglio 117°	Id.	Id.	Coltura di 24 ore dalla *milza*, tenuta 2 giorni a 37° C.		Id.	+ dopo 2 giorni
Coniglio 118°	5 aprile 1897	Da un coniglio inoculato con coltura virulenta, e morto dopo 36 ore.	Coltura di 24 ore dalla *milza*, presa *qualche ora dopo* la morte.		3 gocce normali	+ dopo 36 ore
Coniglio 119°	Id.	Id.	Coltura di 24 ore dai *gangli*, presi *qualche ora dopo* la morte.	1° pass.	Id.	Id.
Coniglio 120°	7 aprile 1897	Id.	Coltura di 24 ore dai *gangli*, tenuti 2 *giorni* a 37° C.	Id.	Id.	+ dopo 2 giorni
Coniglio 121°	Id.	Id.	Coltura di 24 ore dalla *milza*, tenuta 2 *giorni* a 37° C.		Id.	+ dopo 36 ore
Coniglio 122°	10 aprile 1897	Dal coniglio 120°	Coltura di 24 ore dalla *milza*, presa *subito dopo* la morte.		3 gocce normali	+ dopo 36 ore
Coniglio 123°	Id.	Id.	Coltura di 24 ore dai *gangli*, presi *subito dopo* la morte.	2° pass.	Id.	+ dopo 2 giorni

Segue TABELLA VII — *Esperienze eseguite con il diplococco di Fraenkel.*

Animali inoculati	Data dell'inoculazione	Animali dai quali si è preso il materiale per l'inoculazione	Qualità del materiale inoculato	Numero dei passaggi attraverso i gangli linfatici	Quantità della coltura inoculata	Esito della inoculazione
Coniglio 124°	13 aprile 1897	Dal coniglio 120°	Coltura di 24 ore dai *gangli*, tenuti *3 giorni* a 37° C.	2° pass.	3 gocce normali	+ dopo 2 giorni
Coniglio 125°	12 aprile 1897	Id.	Coltura di 24 ore dalla *milza*, tenuta *2 giorni* a 37° C.		Id.	+ dopo 36 ore
Coniglio 126°	13 aprile 1897	Dal coniglio 123°	Coltura di 24 ore dalla *milza*, presa *qualche ora dopo* la morte.		3 gocce normali	+ dopo 36 ore
Coniglio 127°	Id.	Id.	Coltura di 24 ore dai *gangli*, presi *qualche ora dopo* la morte.	3° pass.	Id.	+ dopo 3 giorni
Coniglio 128°	16 aprile 1897	Id.	Coltura di 24 ore dai *gangli*, tenuti *3 giorni* a 37° C.	Id.	Id.	+ dopo 4 giorni
Coniglio 129°	15 aprile 1897	Id.	Coltura di 24 ore dalla *milza*, tenuta *2 giorni* a 37° C.		Id.	+ dopo 2 giorni
Coniglio 130°	18 aprile 1897	Dal coniglio 127°	Coltura di 24 ore dalla *milza*, presa *12 ore dopo* la morte.		3 gocce normali	+ dopo 3 giorni
Coniglio 131°	Id.	Id.	Coltura di 24 ore dai *gangli*, presi *12 ore dopo* la morte.	4° pass.	Id.	Resta in vita, ma è ucciso dopo 24 giorni dall'inoculazione.

Da quanto si è esposto risulta evidente che nei consecutivi passaggi attraverso gli animali recettivi lo pneumococco, mentre nel sangue e nella milza non subisce alcuna modificazione nella sua virulenza, si attenua notevolmente nei gangli linfatici, sino a riuscire non letale per i conigli.

Tale diminuzione della virulenza non si ottiene mai in modo evidente dopo un solo passaggio attraverso i gangli linfatici, ma almeno dopo il secondo passaggio, e tanto più sicuramente quanto più lungo è il soggiorno dello pneumococco nei gangli dell'animale.

Il sistema gangliare linfatico però non si comporta di fronte allo pneumococco ugualmente in tutti i vari individui: quasi sempre agisce attenuandone la virulenza, a volte però non la modifica punto.

Il soggiorno del diplococco di Fraenkel nei gangli linfatici al di fuori dell'organismo, può, benchè in piccola proporzione, contribuire a scemarne la virulenza, e ciò per azione del tessuto glandolare, poichè le colture di pneumococco, ricavate dalla milza, tenuta anche per più giorni a 37° C., nelle medesime condizioni, differiscono poco per virulenza da quelle ottenute dallo stesso organo subito dopo la morte dell'animale.

Risultati analoghi si ottengono se, invece d'inoculare le colture ricavate dai gangli e dalla milza, s'inocula direttamente la pappa ottenuta dalla frammentazione dei medesimi; si sono però preferite le inoculazioni con colture, invece che con emulsione degli organi, non solo per essere sicuri della vitalità dello pneumococco e della purezza del materiale inoculato, ma altresì per evitare l'inoculazione dello pneumococco unitamente al parenchima glandolare.

Debbo ancora far menzione di alcune particolarità notate nei conigli che sono morti tardivamente, ed in quelli sopravvissuti.

In quasi tutti i conigli sia morti con ritardo, sia rimasti in vita, l'edema locale è stato abbastanza intenso, anche più di quello osservato nei conigli morti in breve tempo.

Alla necroscopia dei due conigli, 101° e 102°, inoculati con coltura da gangli di 3° passaggio, e morti l'uno dopo 12, e l'altro dopo 15 giorni, si sono rinvenuti nella milza, nei gangli linfatici e molto più distintamente nel sangue pneumococchi liberi, ed inoltre molti globuli bianchi polinucleati e mononucleati, carichi di granulazioni, le quali trattate col metodo di Pane [1] (fissazione cioè dei preparati nella stufa a secco

[1] *Sulla genesi delle granulazioni cellulari tingibili col bleu di metilene nell'infezione pneumonica e carbonchiosa dei conigli*, Estr. dagli atti della R. Accademia medico-chirurgica di Napoli, anno XLIX, nuova serie, n. 3, 1895.

a 100° per un'ora, e successiva colorazione con bleu di metilene in soluzione acquosa all'1:800) assumevano un colorito violaceo. Di esse alcune presentavano l'aspetto di piccoli granuli rotondeggianti, altre una forma piuttosto lanceolata.

Tale osservazione conferma quella già fatta dal Pane, il quale constatò appunto nell'infezione pneumonica cronica dei conigli, come pure in quella carbonchiosa, la presenza nel sangue, e precisamente nell'interno dei globuli bianchi, di granulazioni, tingibili col bleu di metilene.

Tali granuli, come chiaramente ha dimostrato il detto autore, non sarebbero altro che delle granulazioni batteriche.

Questo fatto è stato pure constatato in quattro conigli sopravvissuti all'infezione, dei quali uno venne ucciso 6 giorni dopo l'inoculazione, un altro dopo 10 giorni, il terzo dopo 15 ed il quarto dopo 22 giorni: nella milza, nei gangli linfatici e nel sangue di detti animali si sono rinvenuti qualche pneumococco libero, e numerosi globuli bianchi, contenenti delle granulazioni tingibili col bleu di metilene. I vari innesti praticati dal sangue, dalla milza e dai gangli hanno dato, benchè lentamente (dopo 48 ore), sviluppo allo pneumococco.

Le inoculazioni fatte con 3 gocce di tali colture ottenute dal sangue e dalla milza hanno ucciso i conigli in 3–4 giorni, quelle praticate con le colture ottenute dai gangli non hanno determinato la morte degli animali.

Uno di questi ultimi conigli sopravvissuti è stato ucciso dopo un mese dall'inoculazione: nel sangue, nella milza e nei gangli si sono notati scarsi globuli bianchi, contenenti delle granulazioni tingibili col bleu di metilene. Nei gangli, e precisamente negli interstizi connettivali esistevano anche dei diplococchi liberi. I soli innesti fatti da questi ultimi sono riusciti fertili.

Inoculando due conigli con 9 gocce di tale coltura, essi sono rimasti in vita.

Un ultimo fatto da notarsi si è che quasi sempre nelle colture ottenute dai gangli gli pneumococchi hanno presentato quasi esclusivamente la forma a catenelle, forma che, come è noto, si suole di preferenza riscontrare nelle colture attenuate.

Riguardo poi alla persistenza dello pneumococco nell'organismo dei conigli che sopravvivono all'infezione, possiamo, in base agli anzidetti risultati affermare che anch'esso, analogamente agli altri batteri, studiati nel precedente capitolo, può conservarsi vitale, per un periodo di tempo più o meno lungo, nell'organismo, e precisamente nel sistema gangliare linfatico.

b) **Tifo.**

Nelle esperienze con il bacillo del tifo mi sono servito di colture di 12-24 ore, ottenute in grossi tubi (di mm. 160 di altezza, e di mm. 22 di diametro interno) di agar a becco di flauto, spalmandone l'intera superficie col materiale batterifero. La patina, che dopo 12 ore si formava, veniva emulsionata in cento parti di acqua distillata e sterile; un centimetro cubo di tale miscela si inoculava nel cellulare sottocutaneo delle cavie.

Gli animali morivano in media dopo 24-36 ore.

Da ciascun animale si son fatte delle colture oltre che dai gangli anche dalla milza, e ciò a titolo di controllo, poichè nei passaggi attraverso la milza degli animali recettivi il bacillo del tifo conserva la sua virulenza.

Praticando infatti delle inoculazioni in serie con colture ottenute dalla milza, ho potuto constatare che anche dopo 20 passaggi attraverso la milza delle cavie, il bacillo del tifo, piuttosto che attenuarsi aumenta la sua virulenza, cosa del resto già nota.

TABELLA VIII — *Esperienze eseguite con il bacillo del tifo.*

Animali inoculati	Data dell'inoculazione	Animali dai quali si è preso il materiale per l'inoculazione	Qualità del materiale inoculato	Numero dei passaggi attraverso i gangli linfatici	Quantità della coltura inoculata	Esito della inoculazione
Cavia 1ª. .	3 marzo 1897	Da cavia inoculata con 1/100 di coltura di grosso tubo d'agar a becco di flauto, e morta dopo 24 ore.	Coltura di 24 ore dalla *milza*, presa *qualche ora dopo* la morte.		1/100 di coltura di 24 ore in grosso tubo d'agar a becco di flauto	+ dopo 24 ore
Cavia 2ª. .	Id.	Id.	Coltura di 24 ore dai *gangli*, presi *qualche ora dopo* la morte.	1° pass.	Id.	+ dopo 2 giorni
Cavia 3ª. .	7 marzo 1897	Id.	Coltura di 24 ore dai *gangli*, tenuti *4 giorni* a 37° C.	Id.	Id.	Id.
Cavia 4ª. .	11 marzo 1897	Id.	Coltura di 24 ore dai *gangli*, tenuti *8 giorni* a 37° C.	Id.	Id.	Id.
Cavia 5ª. .	15 marzo 1897	Id.	Coltura di 24 ore dai *gangli*, tenuti *12 giorni* a 37° C.	Id	Id.	Id.
Cavia 6ª. .	Id.	Id.	Coltura di 24 ore dalla *milza*, tenuta *12 giorni* a 37° C.		Id.	+ dopo 24 ore

Segue TABELLA VIII — *Esperienze eseguite con il bacillo del tifo.*

Animali inoculati	Data dell'inoculazione	Animali dai quali si è preso il materiale per l'inoculazione	Qualità del materiale inoculato	Numero dei passaggi attraverso i gangli linfatici	Quantità della coltura inoculata	Esito della inoculazione
Cavia 7ª. .	5 marzo 1897	Da cavia 1ª	Coltura di 24 ore dalla *milza*, presa *qualche ora dopo* la morte.		1/100 di coltura di 24 ore in grosso tubo d'agar a becco di flauto.	+ dopo 24 ore
Cavia 8ª. .	Id.	Id.	Coltura di 24 ore dai *gangli*, presi *qualche ora dopo* la morte.	1° pass.	Id.	+ dopo 2 giorni
Cavia 9ª. .	9 marzo 1897		Coltura di 24 ore dai *gangli*, tenuti *4 giorni* a 37° C.	Id.	Id.	Id.
Cavia 10ª .	14 marzo 1897		Coltura di 24 ore dai *gangli*, tenuti *9 giorni* a 37° C.	Id.	Id.	Id.
Cavia 11ª .	20 marzo 1897		Coltura di 24 ore dai *gangli*, tenuti *15 giorni* a 37° C.	Id.	Id.	Id.
Cavia 12ª .	Id.		Coltura di 24 ore dalla *milza*, tenuta *15 giorni* a 37° C.		Id.	+ dopo 24 ore

Segue TABELLA VIII — *Esperienze eseguite con il bacillo del tifo.*

Animali inoculati	Data dell'inoculazione	Animali dai quali si è preso il materiale per l'inoculazione	Qualità del materiale inoculato	Numero dei passaggi attraverso i gangli linfatici	Quantità della coltura inoculata	Esito della inoculazione
Cavia 13ª .	6 marzo 1897	Dalla cavia 2ª	Coltura di 24 ore dalla *milza*, presa *subito dopo* la morte.		1/100 di coltura in grosso tubo d'agar a becco di flauto	+ dopo 24 ore
Cavia 14ª .	Id.	Id.	Coltura di 24 ore dai *gangli*, presi *subito dopo* la morte.	2° pass.	Id.	+ dopo 3 giorni
Cavia 15ª .	14 marzo 1897	Id.	Coltura di 24 ore dai *gangli*, tenuti *8 giorni* a 37° C.	Id.	Id.	+ dopo 4 giorni
Cavia 16ª .	21 marzo 1897	Id.	Coltura di 24 ore dai *gangli*, tenuti *15 giorni* a 37° C.	Id.	Id.	Id.
Cavia 17ª .	18 marzo 1897	Id.	Coltura di 24 ore dalla *milza*, tenuta *12 giorni* a 37° C.		Id.	+ dopo 24 ore
Cavia 18ª .	18 marzo 1897	Dalla cavia 5ª	Coltura di 24 ore dalla *milza*, presa *subito dopo* la morte.		1/100 di coltura in grosso tubo d'agar a becco di flauto	+ dopo 24 ore
Cavia 19ª .	Id.	Id.	Coltura di 24 ore dai *gangli*, presi *subito dopo* la morte.	2° pass.	Id.	+ dopo 2 giorni
Cavia 20ª .	22 marzo 1897	Id.	Coltura di 24 ore dai *gangli*, tenuti *4 giorni* a 37° C.	Id.	Id.	Id.

Segue TABELLA VIII — *Esperienze eseguite con il bacillo del tifo.*

Animali inoculati	Data dell'inoculazione	Animali dai quali si è preso il materiale per l'inoculazione	Qualità del materiale inoculato	Numero dei passaggi attraverso i gangli linfatici	Quantità della coltura inoculata	Esito della inoculazione
Cavia 21ª .	26 marzo 1897	Dalla cavia 5ª	Coltura di 24 ore dai *gangli*, tenuti *8 giorni* a 37° C.	2° pass.	1/100 di coltura in grosso tubo d'agar a becco di flauto	+ dopo 36 ore
Cavia 22ª .	30 marzo 1897	Id.	Coltura di 24 ore dai *gangli*, tenuti *12 giorni* a 37° C.	Id.	Id.	+ dopo 2 giorni
Cavia 23ª .	Id.	Id.	Coltura di 24 ore dalla *milza*, tenuta *12 giorni* a 37° C.		Id.	+ dopo 36 ore
Cavia 24ª .	19 marzo 1897	Dalla cavia 15ª	Coltura di 24 ore dalla *milza*, presa *subito dopo* la morte.		1/100 di coltura in grosso tubo d'agar a becco di flauto	+ dopo 36 ore
Cavia 25ª .	Id.	Id.	Coltura di 24 ore dai *gangli*, presi *subito dopo* la morte.	3° pass.	Id.	Vive
Cavia 26ª .	28 marzo 1897	Id.	Coltura di 24 ore dai *gangli*, tenuti *9 giorni* a 37° C.	Id.	Id.	Vive
Cavia 27ª .	29 marzo 1897	Id.	Coltura di 24 ore dalla *milza*, tenuta *10 giorni* a 37° C.		Id.	+ dopo 36 ore

Segue TABELLA VIII — *Esperienze eseguite con il bacillo del tifo.*

Animali inoculati	Data dell'inoculazione	Animali dai quali si è preso il materiale per l'inoculazione	Qualità del materiale inoculato	Numero dei passaggi attraverso i gangli linfatici	Quantità della coltura inoculata	Esito della inoculazione
Cavia 28ª .	21 marzo 1897	Dalla cavia 19ª	Coltura di 24 ore dalla *milza*, presa *alquante ore* dopo la morte.		1/100 di coltura in grosso tubo d'agar a becco di flauto.	+ dopo 24 ore
Cavia 29ª .	Id.	Id.	Coltura di 24 ore dai *gangli*, presi *alquante ore* dopo la morte.	3ª pass.	Id	+ dopo 2 giorni
Cavia 30ª .	26 marzo 1897	Id.	Coltura di 24 ore dai *gangli*, tenuti *5 giorni* a 37° C.	Id.	Id.	Id.
Cavia 31ª .	2 aprile 1897	Id.	Coltura di 24 ore dai *gangli*, tenuti *12 giorni* a 37° C.	Id.	Id.	Id.
Cavia 32ª .	Id.	Id.	Coltura di 24 ore dalla *milza*, tenuta *12 giorni* a 37° C.		Id.	+ dopo 24 ore
Cavia 33ª .	2 aprile 1897	Dalla cavia 22ª	Coltura di 18 ore dalla *milza*, presa *subito dopo* la morte.		1/100 di coltura in grosso tubo d'agar a becco di flauto.	+ dopo 12 ore
Cavia 34ª .	Id.	Id.	Coltura di 18 ore dai *gangli*, presi *subito dopo* la morte.	3ª pass.	Id.	+ dopo 2 giorni

Segue TABELLA VIII — *Esperienze eseguite con il bacillo del tifo.*

Animali inoculati	Data dell'inoculazione	Animali dai quali si è preso il materiale per l'inoculazione	Qualità del materiale inoculato	Numero dei passaggi attraverso i gangli linfatici	Quantità della coltura inoculata	Esito della inoculazione
Cavia 35ª .	7 aprile 1897	Dalla cavia 22ª	Coltura di 24 ore dai *gangli*, tenuti *5 giorni* a 37° C.	5° pass.	1/100 di coltura in grosso tubo d'agar a becco di flauto.	+ dopo 60 ore
Cavia 36ª .	14 aprile 1897	Id.	Coltura di 24 ore dai *gangli*, tenuti *12 giorni* a 37° C.	Id.	Id.	+ dopo 2 giorni
Cavia 37ª .	Id.	Id.	Coltura di 24 ore dalla *milza*, tenuta *12 giorni* a 37° C.		Id.	+ dopo 24 ore
Cavia 38ª .	5 aprile 1897	Dalla cavia 31ª	Coltura di 24 ore dalla *milza*, presa *subito dopo* la morte.		1/100 di coltura in grosso tubo d'agar a becco di flauto.	+ dopo 15 ore
Cavia 39ª .	Id.	Id.	Coltura di 24 ore dai *gangli*, presi *subito dopo* la morte.	4° pass.	Id.	+ dopo 2 giorni
Cavia 40ª .	25 aprile 1897	Id.	Coltura di 24 ore dai *gangli*, tenuti *20 giorni* a 37° C.	Id.	Id.	Id.
Cavia 41ª .	Id.	Id.	Coltura di 24 ore dalla *milza*, tenuta *20 giorni* a 37° C.		Id.	+ dopo 24 ore

Segue Tabella VIII — *Esperienze eseguite con il bacillo del tifo.*

Animali inoculati	Data dell'inoculazione	Animali dai quali si è preso il materiale per l'inoculazione	Qualità del materiale inoculato	Numero dei passaggi attraverso i gangli linfatici	Quantità della coltura inoculata	Esito della inoculazione
Cavia 42ª .	11 aprile 1897	Dalla cavia 35ª	Coltura di 24 ore dalla *milza*, presa *subito dopo* la morte.		1/100 di coltura in grosso tubo d'agar a becco di flauto	+ dopo 24 ore
Cavia 43ª .	Id.	Id.	Coltura di 24 ore dai *gangli*, presi *subito dopo* la morte.	4° pass.	Id.	+ dopo 2 giorni
Cavia 44ª .	21 aprile 1897	Id.	Coltura di 24 ore dai *gangli*, tenuti *10 giorni* a 37° C.	Id.	Id.	Id.
Cavia 45ª .	Id.	Id.	Coltura di 24 ore dalla *milza*, tenuta *10 giorni* a 37° C.		Id.	+ dopo 18 ore

Si è in tal modo continuato a saggiare la virulenza delle colture ricavate dai consecutivi passaggi attraverso i gangli.

Per brevità mi astengo dal riportare in tabelle tali esperienze, essendosi per un certo numero di passaggi ottenuti risultati quasi perfettamente uguali a quelli avuti dalle inoculazioni delle colture gangliari di 4° passaggio; si è avuto cioè un ritardo di 24-36 ore al più, negli animali inoculati con le colture ottenute dai gangli. Mi limito semplicemente ad esporre i risultati ultimi delle dette esperienze.

Segue TABELLA VIII — *Esperienze eseguite con il bacillo del tifo.*

Animali inoculati	Data dell'inoculazione	Animali dai quali si è preso il materiale per l'inoculazione	Qualità del materiale inoculato	Numero dei passaggi attraverso i gangli linfatici	Quantità della coltura inoculata	Esito della inoculazione
Cavia 86ª .	1 maggio 1897	Dalla cavia 79ª, inoculata con coltura di *gangli* di 11° pass. e morta dopo 60 ore.	Coltura di 24 ore dalla *milza*, presa *subito dopo* la morte.		1/100 di coltura in grosso tubo d'agar a becco di flauto.	+ dopo 24 ore
Cavia 87ª .	Id.	Id.	Coltura di 24 ore dai *gangli*, presi *subito dopo* la morte.	12° pass.	Id.	+ dopo 65 ore
Cavia 88ª .	10 maggio 1897	Id.	Coltura di 24 ore dai *gangli*, tenuti *9 giorni* a 37° C.	Id.	Id.	Id.
Cavia 89ª .	Id.	Id.	Coltura di 24 ore dalla *milza*, tenuta *9 giorni* a 37° C.		Id.	+ dopo 24 ore
Cavia 90ª .	5 maggio 1897	Dalla cavia 79ª	Coltura di 24 ore dalla *milza*, presa *subito dopo* la morte.		1/100 di coltura in grosso tubo d'agar a becco di flauto.	+ dopo 24 ore
Cavia 91ª .	Id.	Id.	Coltura di 24 ore dai *gangli*, presi *subito dopo* la morte.	13° pass.	Id.	+ dopo 3 giorni
Cavia 92ª .	14 maggio 1897	Id.	Coltura di 24 ore dai *gangli*, tenuti *9 giorni* a 37° C.	Id.	Id.	Id.
Cavia 93ª .	Id.	Id.	Coltura di 24 ore dalla *milza*, tenuta *9 giorni* a 37° C.		Id.	+ dopo 36 ore

Segue Tabella VIII — *Esperienze eseguite con il bacillo del tifo.*

Animali inoculati	Data dell'inoculazione	Animali dai quali si è preso il materiale per l'inoculazione	Qualità del materiale inoculato	Numero dei passaggi attraverso i gangli linfatici	Quantità della coltura inoculata	Esito della inoculazione
Cavia 94ª .	9 maggio 1897	Dalla cavia 91ª	Coltura di 24 ore dalla *milza*, presa *subito dopo* la morte.		1/100 di coltura in grosso tubo d'agar a becco di flauto.	+ dopo 36 ore
Cavia 95ª .	Id.	Id.	Coltura di 24 ore dai *gangli*, presi *subito dopo* la morte.	14° pass.	Id.	+ dopo 7 giorni
Cavia 96ª .	21 maggio 1897	Id.	Coltura di 24 ore dai *gangli*, tenuti *12 giorni* a 37° C.	Id.	Id.	+ dopo 8 giorni
Cavia 97ª .	Id.	Id.	Coltura di 24 ore dalla *milza*, tenuta *12 giorni* a 37° C.		Id.	+ dopo 36 ore
Cavia 98ª .	18 maggio 1897	Dalla cavia 95ª	Coltura di 24 ore dalla *milza*, presa *12 ore dopo* la morte.		1/100 di coltura in grosso tubo d'agar a becco di flauto.	+ dopo 3 giorni
Cavia 99ª .	Id.	Id.	Coltura di 24 ore dai *gangli*, presi *12 ore dopo* la morte.	15° pass.	Id.	Vive
Cavia 100ª .	30 maggio 1897	Id.	Coltura di 24 ore dai *gangli*, tenuti *12 giorni* a 37° C.	Id.	Id.	Vive
Cavia 101ª .	Id.	Id.	Coltura di 24 ore dalla *milza*, tenuta *12 giorni* a 37° C.		Id.	+ dopo 3 giorni

Segue TABELLA VIII — *Esperienze eseguite con il bacillo del tifo.*

Animali inoculati	Data dell'inoculazione	Animali dai quali si è preso il materiale per l'inoculazione	Qualità del materiale inoculato	Numero dei passaggi attraverso i gangli linfatici	Quantità della coltura inoculata	Esito della inoculazione
Cavia 102ª.	30 maggio 1897	Dalla cavia 96ª	Coltura di 24 ore dalla *milza*, presa *subito dopo* la morte.		1/100 di coltura in grosso tubo d'agar a becco di flauto	+ dopo 4 giorni
Cavia 103ª.	Id.	Id.	Coltura di 24 ore dai *gangli*, presi *subito dopo* la morte.	15° pass.	Id.	Vive
Cavia 104ª.	2 maggio 1897	Dalla cavia inoculata con *gangli* di 7° passaggio, e morta dopo 60 ore.	Coltura di 24 ore dalla *milza*, presa *subito dopo* la morte.		1/100 di coltura in grosso tubo d'agar a becco di flauto	+ dopo 24 ore
Cavia 105ª.	Id.	Id.	Coltura di 24 ore dai *gangli*, presi *subito dopo* la morte.	8° pass.	Id.	+ dopo 5 giorni
Cavia 106ª.	17 maggio 1897	Id.	Coltura di 24 ore dai *gangli*, tenuti *15 giorni* a 37° C.	Id.	Id.	+ dopo 4 giorni
Cavia 107ª.	Id.	Id.	Coltura di 24 ore dalla *milza*, tenuta *15 giorni* a 37° C.		Id.	+ dopo 24 ore

Segue TABELLA VIII — *Esperienze eseguite con il bacillo del tifo.*

Animali inoculati	Data dell'inoculazione	Animali dai quali si è preso il materiale per l'inoculazione	Qualità del materiale inoculato	Numero dei passaggi attraverso i gangli linfatici	Quantità della coltura inoculata	Esito della inoculazione
Cavia 108ª.	8 maggio 1897	Dalla cavia 105ª	Coltura di 24 ore dalla *milza*, presa *subito dopo* la morte.		1/100 di coltura in grosso tubo d'agar a becco di flauto	+ dopo 3 giorni
Cavia 109ª.	Id.	Id.	Coltura di 24 ore dai *gangli*, presi *subito dopo* la morte.	9° pass.	Id.	Vive
Cavia 110ª.	22 maggio 1897	Dalla cavia 106ª	Coltura di 24 ore dalla *milza*, presa *subito dopo* la morte.		1/100 di coltura in grosso tubo d'agar a becco di flauto	+ dopo 36 ore
Cavia 111ª.	Id.	Id.	Coltura di 24 ore dai *gangli*, presi *subito dopo* la morte.	9° pass.	Id.	Vive
Cavia 112ª.	31 maggio 1897	Id.	Coltura di 24 ore dai *gangli*, tenuti *9 giorni* a 37° C.	Id.	Id.	Id.
Cavia 113ª.	Id.	Id.	Coltura di 24 ore dalla *milza*, tenuta *9 giorni* a 37° C.		Id.	+ dopo 36 ore

Prima di concludere riguardo al bacillo del tifo è da notare che in un' altra serie di esperienze, anche dopo 21 passaggi attraverso i gangli linfatici delle cavie, non si è avuta notevole diminuzione di virulenza delle colture gangliari; si è osservato al più un ritardo di 1–2 giorni nella morte degli animali, inoculati con tali colture.

Si sono inoltre praticate delle inoculazioni con pappa della milza e dei gangli di animali tifosi. La quantità però di materiale battirifero ricavata dai vari gangli dell'animale è stata piuttosto scarsa, per cui non è riuscita letale, e che ciò dipendesse dalla piccola quantità del materiale inoculato, lo prova il fatto che anche una uguale quantità di pappa, ottenuta dalla milza di animali tifosi, non ha ucciso le cavie.

Dalle esperienze adunque eseguite risulta che le colture gangliari del bacillo del tifo presentano una virulenza minore delle colture ottenute dalla milza, e possono sovente dopo vari passaggi riuscire perfino non letali.

Il soggiorno di 8–12–15–20 giorni dei detti bacilli nei gangli linfatici, fuori dell'organismo animale, non li modifica notevolmente. Il prolungato soggiorno però dei bacilli del tifo nei gangli linfatici viventi ne attenua in una maniera assai evidente la virulenza.

Infatti, facendo sì che l'animale resti in vita per un tempo più o meno lungo, uccidendo cioè delle cavie, inoculate con una dose non letale di coltura, dopo un certo numero di giorni, e praticando così gl'innesti dai gangli in periodi di tempo differenti, si è constatato che le cavie inoculate con le colture gangliari, dopo un soggiorno di 9–15 e più giorni dei batteri del tifo nei gangli linfatici, sopravvivono, pur presentando i primi giorni dopo l' inoculazione dei disturbi generali abbastanza gravi, e fatti di reazione locale assai intensi.

In tali esperieze però viene quasi costantemente a mancare come termine di paragone la coltura della milza, giacchè, come si è detto nel capitolo precedente, i batteri scompaiono abbastanza presto dai vari organi, eccettuati i gangli linfatici. Tuttavia uccidendo gli animali dopo 4–5–6 giorni, prima cioè che dalla milza scompaiano totalmente i detti germi, si constata già una certa attenuazione delle colture ricavate dai gangli linfatici, rispetto a quelle ottenute dalla milza; mentre queste infatti ammazzano le cavie in 24-36 ore, quelle le uccidono con un ritardo di 1 a 3 giorni.

In seguito, quando ci viene a mancare come termine di confronto la coltura della milza, noi possiamo sempre paragonare la virulenza dei bacilli, ricavati dalle glandole linfatiche, con quella che i medesimi possedevano prima del loro soggiorno nell' organismo di quel dato animale.

I gangli linfatici degli animali poco sensibili all'infezione tifica godono anch' essi del potere di attenuare i bacilli del tifo, purchè questi vi soggiornino per un certo tempo.

Inoculando infatti dei cani con dose non letale di coltura, e uccidendoli dopo 2–4–6–10–15 giorni si constata che già, dal 4° al 6° giorno le colture ricavate dai gangli uccidono le cavie in media dopo 3-7 giorni, qualche volta però anche dopo 36 ore.

Un soggiorno di 10, e meglio ancora di 15 e più giorni del bacillo tifico nei gangli linfatici del cane, gli fa perdere quasi del tutto la sua virulenza.

Non esiste quindi notevole differenza tra la maniera di comportarsi dei gangli degli animali molto sensibili, e di quelli degli animali poco recettivi, riguardo alla virulenza del bacillo tifico; sì negli uni che negli altri essa può nelle glandole linfatiche attenuarsi, sino al punto da non uccidere più le cavie.

In generale, quanto più lungo è il soggiorno dei microrganismi nel parenchima glandolare vivente, altrettanto maggiore è l' attenuazione dai medesimi subìta.

c) **Stafilococco piogeno aureo.**

I risultati ottenuti dalle esperienze eseguite con lo stafilococco piogeno aureo sono in gran parte uguali a quelli avuti per il tifo. Tralascerò quindi di esporle in tabelle, limitandomi solo ad accennare ai risultati dalle medesime ricavati.

Siamo, al solito, partiti da una coltura in brodo di virulenza determinata, 3 cc., della quale, inoculati nel cellulare sottocutaneo, uccidevano gli animali dopo 36-48 ore.

Dopo essermi assicurato che nei passaggi successivi attraverso la milza delle cavie lo stafilococco aureo non subiva attenuazione alcuna, ho praticato, come per il tifo, delle inoculazioni in serie nelle cavie con colture ricavate successivamente dai gangli linfatici, sia presi subito dopo la morte, sia dopo un soggiorno di 2-20 giorni nella stufa a 37° C.

Le colture ganglionari di 1°, 2° e 3° passaggio hanno ucciso gli animali senza ritardo alcuno degno di nota; con le colture invece ricavate dai gangli di 4° passaggio si è arrivato, ma non sempre (4 volte sopra 6 esperienze), ad ottenere un ritardo di 2-3 giorni nella morte degli animali.

Tale ritardo si è accentuato nelle inoculazioni con colture di 5° passaggio: di 8 cavie infatti inoculate con tali colture, una è morta senza ritardo, due sono morte dopo 5 giorni, quattro dopo 7 giorni, una è rimasta in vita.

Le colture ricavate dai gangli di tali animali, morti dopo 4 e 7 giorni,

inoculate nelle cavie, hanno determinato un' intensa reazione locale, ma non la morte.

Nelle varie serie di esperienze eseguite, in due casi solamente, malgrado 20 passaggi consecutivi attraverso i gangli linfatici, non si ebbe nella morte degli animali un ritardo maggiore di 1 a 2 giorni.

In un altro caso la perdita della virulenza delle colture ganglionari si ottenne solo al 14° passaggio.

La dimora fuori dell'organismo, prolungata sino al 20° giorno, dello stafilococco piogeno nei gangli linfatici alla temperatura di 37° C., non ne ha modificato gran fatto la virulenza; il soggiorno invece dello stesso microrganismo nelle glandole linfatiche viventi lo attenua notevolmente.

Praticando infatti, come per il tifo, delle inoculazioni con colture ottenute dai gangli e dalla milza di cavie, inoculate con dosi non letali di stafilococco piogeno aureo, ed uccise dopo 4 giorni, si è osservato che mentre gli animali, inoculati con colture ottenute dalla milza, sono morti in 24 ore, quelli inoculati con colture dai gangli, sono morti dopo 2-3 giorni. Inoculando delle cavie con colture ricavate dai gangli di animali uccisi dopo 6-9 giorni, si è arrivato ad avere la morte delle cavie in 5-7 giorni. Con un più lungo soggiorno nelle glandule linfatiche, lo stafilococco piogeno aureo arriva a non determinare più la morte degli animali; infatti in 9 esperienze, eseguite con colture prese dai gangli di cavie, uccise dopo 9-15-25 giorni dall' inoculazione, si è constatato che tali colture gangliari hanno determinato un' infezione grave sì, ma non letale, tanto che gli animali dopo qualche tempo si sono completamente ristabiliti.

Quanto alle inoculazioni praticate con pappa di gangli e di milza degli animali morti per infezione stafilococcica, vale quanto si è detto parlando del bacillo del tifo.

d) Carbonchio.

Il Phisalix [1] in alcune sue ricerche sulla malattia carbonchiosa, si è specialmente occupato dell' influenza che esercitano i gangli linfatici sui bacilli del carbonchio.

Egli ha potuto riscontrare che tra le forme non molto virulente del *bacillus anthracis*, e le forme inoffensive esiste un anello di congiunzione, rappresentato da altre forme di virulenza intermedia, determinanti un' infezione carbonchiosa ad evoluzione lenta, caratterizzata dal fatto che il bacillo del carbonchio non si moltiplica nè nel sangue, nè nei visceri, ma si localizza nei gangli linfatici, dove resta allo stato latente per un tempo

---

[1] *Nouvelles recherches sur la maladie charbonneuse.* (*Production expérimentale d'un charbon chronique*). Archives de Médicine expérimentale et d'Anatomie patologique, t. XIII, 1891, pag. 159.

variabile dai 20 ai 72 giorni, senza determinare nessun disturbo. In seguito l'animale cade d'un tratto ammalato, e muore dopo alquante ore. All'autopsia i bacilli carbonchiosi si rinvengono solo nei gangli linfatici vicini, e spesso anche in quelli assai lontani dal punto d'inoculazione; però i detti germi si presentano sotto forma di cocchi o diplococchi, ovvero di corti frammenti, e solamente nelle colture riacquistano i loro primitivi caratteri.

Ma anche la virulenza del bacillo carbonchioso è, secondo il Phisalix, notevolmente modificata durante il soggiorno nei gangli linfatici: le colture ganglionari infatti dei bacilli carbonchiosi, specialmente se ricavate dai gangli di un animale più elevato di quelli ai quali si praticava l'inoculazione, si attenuano al punto da perdere completamente la loro virulenza; proprietà che persiste per un certo numero di generazioni.

Il Phisalix, inoltre, ha anche constatato che il bacillo del carbonchio, sprovvisto completamente della sua virulenza, può soggiornare per lungo tempo, anche 26 giorni, nelle glandole linfatiche, mantenendosi vitale.

Nelle ricerche da me eseguite sul comportamento dei bacilli carbonchiosi nei gangli linfatici, ho cominciato anzitutto a vedere se fosse possibile, partendo da una coltura virulentissima di carbonchio, ottenere, mercè successivi passaggi attraverso i gangli linfatici di animali recettivi, quali le cavie e i conigli, delle colture attenuate, e se si potessero riprodurre nelle forme bacillari quelle modificazioni morfologiche, già osservate dal Phisalix.

Siccome il detto autore ha esperimentato a preferenza sui gangli vicini al punto d'inoculazione, ho voluto estendere anche a questi ultimi le ricerche; però, essendo tali gangli impigliati in una massa di tessuti edematosi, ricchi, come si sa, di bacilli, li ho, dopo averli accuratamente sgusciati, sottoposti prima ad abbondanti lavaggi con soluzione fisiologica sterilizzata di cloruro sodico, poi ad un lieve arroventamento della loro superficie, e finalmente ad altri ripetuti lavaggi.

Con tale tecnica si eliminano, in una maniera sicura, le cause di errore, dovute alla presenza sulla superficie dei gangli vicini al punto d'inoculazione di quei batteri, appartenenti all'edema.

Nelle numerose esperienze fatte col bacillo del carbonchio virulento, si sono avuti i risultati seguenti: gli animali, inoculati con colture ottenute dalla milza (una goccia di coltura in brodo), sono morti dopo 24-36 ore, quelli inoculati con uguale quantità di coltura ottenuta dai gangli, sia vicini al punto d'inoculazione, che a distanza, sono morti dopo 48 60 ore al massimo, qualcuno anche dopo 36 ore.

Identici risultati si sono ottenuti con le inoculazioni di pappa della milza e dei gangli di cavie carbonchiose, prendendo però dell'emulsione di questi ultimi una dose maggiore, in guisa da avere presso a poco la stessa quantità di bacilli tanto dai gangli che dalla milza. Tale dose è stata dopo parecchi tentativi approssimativamente stabilita mercè le culture isolanti su piastre d'agar: si è constatato che, per avere in media la stessa quantità di bacilli, occorre per un'ansa di pappa della milza, 5 anse di pappa dei gangli.

Facendo delle inoculazioni in serie, sia con pappa dei gangli, sia con colture ottenute dai medesimi, si è assodato che anche dopo 80 passaggi non si ha nella morte degli animali un ritardo più spiccato di quello che si ottiene dalle inoculazioni di colture da gangli di 1° o 2° passaggio.

Solamente una cavia, inoculata con una goccia di coltura dai gangli di 3° passaggio, è morta 4 giorni dopo l'inoculazione. Le colture ricavate dai gangli di tale cavia hanno determinato al solito la morte in 48-60 ore.

Partendo adunque da una coltura di carbonchio molto virulento, non si è potuto ottenere una notevole attenuazione dei bacilli carbonchiosi nelle glandole linfatiche.

Però in base a tali esperienze non possiamo concludere che i gangli linfatici non attenuino i bacilli del carbonchio.

I microrganismi, infatti, che nell'infezione carbonchiosa si trovano in grande numero nei gangli linfatici, e che si riproducono nelle colture, non provengono tutti dagl'interstizi del parenchima glandolare; gran parte di essi esistono nei capillari sanguigni, che irrigano il ganglio. Tali germi, che si trovano nei vasi sanguigni, molto probabilmente non subiscono l'influenza del parenchima glandolare, ma avranno la stessa virulenza dei batteri esistenti nel resto della massa sanguigna, per cui nelle culture si avranno dei batteri in via di attenuazione, e degli altri dotati di tutta la loro virulenza.

Ciò però dovrebbe altresì constatarsi nelle infezioni pneumonica, tifica, stafilococcica, in cui al contrario si è avuta un'attenuazione delle colture ricavate dai gangli.

Tali fatti, a prima vista in opposizione fra di loro, si confermano a vicenda: anche per queste ultime infezioni, come dirò in seguito, si è constatato che, sino a quando esistono dei germi nel sangue in grande quantità, le colture gangliari mostrano un'attenuazione non molto accentuata.

Man mano che si procede nei successivi passaggi attraverso i gangli, tale attenuazione si rende più evidente, e gli animali muoiono dopo un tempo alquanto più lungo. In tali animali all'autopsia si riscontrano pochi batteri liberi nel sangue, alcuni di essi si trovano, come si è visto per lo pneumococco, in via di disfacimento nei globuli bianchi, allo stato cioè di granulazioni; nelle colture dai gangli quindi avranno a poco a poco la preponderanza i germi provenienti dagl'interstizi del parenchima glandolare, germi cioè notevolmente attenuati.

Non è poi nemmeno da trascurarsi la varia resistenza dei differenti batteri su cui si esperimenta. Lo pneumococco, infatti, il quale, come è noto, perde rapidamente non solo la propria virulenza, ma perfino la sua vitalità, nei gangli linfatici, come abbiamo visto, si attenua sovente abbastanza presto. Il bacillo del tifo e lo stafilococco piogeno aureo hanno bisogno di un tempo più lungo per attenuarsi. Il bacillo del carbonchio, infine, che è un microrganismo assai più resistente dei precedenti agli agenti di attenuazione, difficilmente perde la sua virulenza.

È chiaro quindi che, partendo da colture virulentissime di carbonchio,

non si può, malgrado numerosi passaggi attraverso i gangli linfatici, ottenere un'attenuazione notevole, poichè da una parte, determinandosi negli animali una morte rapida, i bacilli subiscono per breve tempo l'influenza del parenchima glandolare, dall'altra essendo dei microrganismi abbastanza resistenti all'attenuazione, è indispensabile che l'influenza attenuatrice del parenchima glandolare si eserciti su di essi per un tempo assai più lungo che per gli altri batteri.

Per meglio chiarire tali concetti, si è eseguita un'altra serie di esperienze con colture attenuate di bacilli carbonchiosi; in tal guisa si è riusciti a prolungare il soggiorno dei bacilli nei gangli linfatici, ed a far sì che l'influenza attenuatrice dei gangli potesse, esercitandosi su microrganismi già in via di attenuazione, in maniera molto più evidente manifestarsi.

Ci siamo serviti in tali ricerche di colture attenuate col metodo Pasteur, facendo cioè sviluppare i bacilli del carbonchio a 42°-43° C. per più giorni.

Le colture in brodo, sviluppatesi per 40 giorni a tale temperatura, uccidevano un terzo delle cavie inoculate dopo 5 giorni; talvolta però gli animali sono sopravvissuti.

All'autopsia di dette cavie, i bacilli carbonchiosi sono stati rinvenuti in grande quantità nella milza e nei gangli linfatici, in numero piuttosto scarso anche nel sangue.

Da uno di tali animali, morto cioè dopo 5 giorni, si sono inoculate 12 cavie con mezzo cc. di coltura di 24 ore in brodo ricavata dalla milza, ed altre 12 con uguale quantità di coltura, ricavata dai gangli linfatici.

Delle 12 cavie inoculate con coltura dalla milza, due sono morte al 4° giorno, sette al 5° giorno, altre due al 6° giorno dopo l'inoculazione. Una sola è sopravvissuta.

Delle cavie invece inoculate con colture dai gangli, una morì al quarto giorno, un'altra al quinto, e due al sesto giorno; le altre otto sono rimaste in vita, pur presentando lieve edema nel punto d'inoculazione.

Da tali esperienze risulta evidente l'influenza attenuatrice esercitata dai gangli linfatici anche sui bacilli del carbonchio; è bastato infatti un semplice passaggio di tali bacilli, in parte attenuati, attraverso le glandole linfatiche, per aversi la perdita quasi completa della loro virulenza. E ciò contrariamente a quanto si osserva per le colture ricavate dalla milza, le quali più che un'attenuazione hanno presentato un certo aumento di virulenza.

Anche per altra via sono riuscito a dimostrare il potere attenuante dei gangli linfatici sui bacilli carbonchiosi virulenti, tentando cioè di far localizzare questi ultimi nei soli gangli linfatici. A tale intento si sono praticate delle inoculazioni nella camera anteriore dell'occhio delle cavie, meglio ancora dei conigli, avendo cura di non apportare lesione alcuna nella congiuntiva. Gli animali così inoculati sono sopravvissuti. All'autopsia di due cavie, uccise l'una dopo 4, l'altra dopo 5 giorni, si sono rinvenuti numerosi bacilli nei gangli linfatici non solo, ma anche nella milza; pochi nel sangue.

Tali bacilli, compresi quelli dei gangli, hanno però ucciso le cavie dopo 48-60 ore.

Nelle cavie e nei conigli uccisi dopo 10 giorni non si sono nei vari organi riscontrati bacilli del carbonchio; solo dai gangli, e precisamente da quelli carotidei, si ebbe talvolta la presenza di 3-6 colonie di carbonchio; il più delle volte però non si è avuto sviluppo alcuno di bacilli. Uccidendo gli animali dopo 15 giorni non si sono più rinvenuti nelle glandole linfatiche bacilli di carbonchio. Solo in un coniglio ucciso 20 giorni dopo l'inoculazione si rinvennero nei gangli 3 colonie di carbonchio

Di 7 animali (3 cavie e 4 conigli), inoculati con $^1/_2$ cc. di colture di bacilli carbonchiosi ricavati dai gangli delle dette cavie e conigli, uccisi 10 giorni dopo l'inoculazione nella camera anteriore, sei sono rimasti in vita, una sola cavia è morta dopo 6 giorni.

È da ammettersi adunque che nel passaggio attraverso le vie linfatiche; i bacilli del carbonchio sieno stati attenuati.

Si è inoltre ricorso all' innesto cutaneo, strofinando mercè una spazzola sottile delle colture di carbonchio virulento sulla cute delle cavie, dopo averne tagliato accuratamente i peli. Le cavie sono rimaste in vita. Uccidendole dopo 2-4 giorni, nei vari organi, eccettuati i gangli linfatici, non si sono rinvenuti bacilli di carbonchio. Nei gangli linfatici la quantità di bacilli rinvenuti è stata assai scarsa (2-5 per ganglio). Tali bacilli coltivati ed inoculati alle cavie le hanno uccise dopo 48-60 ore. Uccidendo gli animali, inoculati per la via cutanea, dopo 5-9 giorni non si rinvengono più nemmeno nei gangli i bacilli del carbonchio.

Dobbiamo quindi ammettere che i bacilli carbonchiosi virulenti penetrando in piccola quantità nell'organismo attraverso le vie linfatiche, vengano quivi a subire un'attenuazione transitoria, tanto da non determinare la morte degli animali nei cui gangli albergano; basta però trasportarli in un altro animale molto sensibile a quella determinata infezione, perchè i detti bacilli riacquistino la loro virulenza. Per aversi un'attenuazione duratura dei bacilli carbonchiosi nei gangli linfatici è necessario esperimentare su microrganismi in via di attenuazione, o prolungare per 10 e più giorni la dimora dei microrganismi nei gangli linfatici, il che non sempre si riesce ad ottenere, appunto perchè quando i bacilli carbonchiosi, che arrivano ai gangli linfatici, sono in numero assai scarso, essi, pur localizzandosi in questi soli organi, vengano dai medesimi a scomparire in un periodo di tempo relativamente breve.

Nei gangli linfatici degli animali refrattari l'attenuazione dei bacilli carbonchiosi si può ottenere, ma in un periodo di tempo approssimativamente uguale a quello necessario per l'attenuazione dei medesimi bacilli nei gangli degli animali recettivi. Mancano però in tali esperienze, come termine di confronto, le colture dalla milza. Nei detti animali, ad esempio i cani, come si è constatato nel capitolo precedente, i bacilli del carbonchio, scomparsi già abbastanza presto dai vari organi dell' economia, si conservano per un certo tempo nelle sole glandole linfatiche.

Or bene, se si saggia la virulenza di tali bacilli, dopo una dimora di 5 giorni nei gangli del cane, si constata che essi uccidono le cavie in 3-4 giorni; dopo una dimora di 10-15-25 giorni le cavie quasi costantemente (8 volte su 10) sopravvivono.

Dalle molteplici e svariate esperienze, praticate con i bacilli del carbonchio, si può adunque concludere che anche su tali bacilli il sistema gangliare linfatico spiega la sua influenza, diminuendo notevolmente la loro virulenza. Non mi è però mai riuscito di riscontrare nei bacilli carbonchiosi modificazioni morfologiche degne di nota.

e) Peste bubonica.

Essendo la peste una di quelle infezioni che colpiscono a preferenza gli organi linfatici, ed in prima linea i gangli, abbiamo creduto interessante lo studio delle modificazioni subìte dal bacillo della peste nei gangli linfatici.

Mi sono servito in tali esperienze di colture in agar, un' ansa delle quali, inoculata nel cellulare sottocutaneo delle cavie, uccideva gli animali dopo 4-5 giorni.

Dopo avere, come per tutti gli altri bacilli, accertato che nei successivi passaggi attraverso la milza, il bacillo della peste non subiva attenuazione alcuna, ho cominciato a saggiare la virulenza delle colture gangliari. Ho creduto inutile di esaminare anche la virulenza delle colture ricavate dai gangli tenute per uno o più giorni a 37° C., essendosi nelle esperienze eseguite con gli altri batteri dimostrato, che il prolungato soggiorno dei bacilli nei gangli, in istufa a 37° C., non determina notevoli modificazioni nella loro virulenza.

Riporto in un quadro le esperienze eseguite:

TABELLA IX — *Esperienze eseguite con il bacillo della peste bubonica.*

Animali inoculati	Data dell'inoculazione	Animali dai quali si è preso il materiale per l'inoculazione	Qualità del materiale inoculato	Numero dei passaggi attraverso i gangli linfatici	Quantità della coltura inoculata	Esito della inoculazione
Cavia 1ª . .	26 luglio 1897	Da una cavia inoculata con un'ansa di coltura virulenta e morta dopo 5 giorni.	Coltura di 3 giorni ottenuta dalla *milza*.		Un'ansa di coltura in agar.	+ dopo 4 giorni
Cavia 2ª . .	Id.	Id.	Coltura di 3 giorni dai *gangli*	1° pass.	Id.	Id.
Cavia 3ª . .	2 agosto 1897	Dalla cavia 2ª	Coltura di 3 giorni dalla *milza*.		Un'ansa di coltura in agar.	+ dopo 4 giorni
Cavia 4ª . .	Id.	Id.	Coltura di 3 giorni dai *gangli*.	2° pass.	Id.	+ dopo 5 giorni
Cavia 5ª . .	2 agosto 1897	Dalla cavia 1ª	Coltura di 3 giorni dalla *milza*.		Un'ansa di coltura in agar.	+ dopo 5 giorni
Cavia 6ª . .	Id.	Id.	Coltura di 3 giorni dai *gangli*.	1° pass.	Id.	Id.
Cavia 7ª . .	10 agosto 1897	Dalla cavia 4ª	Coltura di 3 giorni dalla *milza*.		Un'ansa di coltura in agar.	+ dopo 5 giorni
Cavia 8ª . .	Id.	Id.	Coltura di 3 giorni dai *gangli*.	3° pass.	Id.	Id.

Segue TABELLA IX — *Esperienze eseguite con il bacillo della peste bubonica.*

Animali inoculati	Data dell'inoculazione	Animali dai quali si è preso il materiale per l'inoculazione	Qualità del materiale inoculato	Numero dei passaggi attraverso i gangli linfatici	Quantità della coltura inoculata	Esito della inoculazione
Cavia 9ª . .	10 agosto 1897	Dalla cavia 3ª	Coltura di 3 giorni dalla *milza*.		Un'ansa di coltura in agar.	+ dopo 5 giorni
Cavia 10ª .	Id.	Id.	Coltura di 3 giorni dai *gangli*.	1° pass.	Id.	+ dopo 6 giorni
Cavia 11ª. .	11 agosto 1897	Dalla cavia 6ª	Coltura di 3 giorni dalla *milza*.		Un'ansa di coltura in agar.	+ dopo 5 giorni
Cavia 12ª. .	Id.	Id.	Coltura di 3 giorni dai *gangli*.	2° pass.	Id.	+ dopo 6 giorni
Cavia 13ª. .	11 agosto 1897	Dalla cavia 5ª	Coltura di 4 giorni dalla *milza*.		Un'ansa di coltura in agar.	+ dopo 4 giorni
Cavia 14ª. .	Id.	Id.	Coltura di 4 giorni dai *gangli*.	1° pass.	Id.	+ dopo 6 giorni
Cavia 15ª. .	19 agosto 1897	Dalla cavia 10ª	Coltura di 3 giorni dalla *milza*.		Un'ansa di coltura in agar.	+ dopo 6 giorni
Cavia 16ª. .	Id.	Id.	Coltura di 3 giorni dai *gangli*.	2° pass.	Id.	+ dopo 9 giorni

Segue TABELLA IX *Esperienze eseguite con il bacillo della peste bubonica.*

Animali inoculati	Data dell'inoculazione	Animali dai quali si è preso il materiale per l'inoculazione	Qualità del materiale inoculato	Numero dei passaggi attraverso i gangli linfatici	Quantità della coltura inoculata	Esito della inoculazione
Cavia 17ª. .	20 agosto 1897	Dalla cavia 14ª	Coltura di 3 giorni dalla *milza*.		Un'ansa di coltura in agar.	+ dopo 4 giorni
Cavia 18ª. .	Id.	Id.	Coltura di 3 giorni dai *gangli*.	2° pass.	Id.	+ dopo 6 giorni
Cavia 19ª. .	20 agosto 1897	Dalla cavia 12ª	Coltura di 3 giorni dalla *milza*.		Un'ansa di coltura in agar.	+ dopo 5 giorni
Cavia 20ª. .	Id.	Id.	Coltura di 3 giorni dai *gangli*.	3° pass.	Id.	+ dopo 9 giorni
Cavia 21ª. .	21 agosto 1847	Dalla cavia 8ª	Coltura di 3 giorni dalla *milza*		Un'ansa di coltura in agar.	+ dopo 6 giorni
Cavia 22ª. .	Id.	Id.	Coltura di 3 giorni dai *gangli*.	4° pass.	Id.	Vive
Cavia 23ª. .	30 agosto 1897	Dalla cavia 18ª	Coltura di 4 giorni dalla *milza*.		Un'ansa di coltura in agar.	+ dopo 5 giorni
Cavia 24ª. .	Id.	Id.	Coltura di 4 giorni dai *gangli*.	3° pass.	Id.	+ dopo 8 giorni

Segue TABELLA IX — *Esperienze eseguite con il bacillo della peste bubonica.*

Animali inoculati	Data dell'inoculazione	Animali dai quali si è preso il materiale per l'inoculazione	Qualità del materiale inoculato	Numero dei passaggi attraverso i gangli linfatici	Quantità della coltura inoculata	Esito della inoculazione
Cavia 25ª. .	31 agosto 1897	Dalla cavia 16ª	Coltura di 3 giorni dalla *milza*.		Un'ansa di coltura in agar.	+ dopo 6 giorni
Cavia 26ª. .	Id.	Id.	Coltura di 3 giorni dai *gangli*.	8° pass	Id.	+ dopo 9 giorni
Cavia 27ª. .	1 settem. 1897	Dalla cavia 20ª	Coltura di 3 giorni dalla *milza*.		Un'ansa di coltura in agar.	+ dopo 7 giorni
Cavia 28ª. .	Id.	Id.	Coltura di 3 giorni dai *gangli*.	4° pass.	Id.	+ dopo 8 giorni
Cavia 29ª. .	10 settem. 1897	Dalla cavia 24ª	Coltura di 3 giorni dalla *milza*.		Un'ansa di coltura in agar.	+ dopo 6 giorni
Cavia 30ª. .	Id.	Id.	Coltura di 3 giorni dai *gangli*.	4° pass	Id.	+ dopo 10 giorni
Cavia 31ª. .	12 settem. 1897	Dalla cavia 26ª	Coltura di 3 giorni dalla *milza*.		Un'ansa di coltura in agar.	+ dopo 7 giorni
Cavia 32ª. .	Id.	Id.	Coltura di 3 giorni dai *gangli*.	4° pass.	Id.	Vive

Segue TABELLA IX. — *Esperienze eseguite con il bacillo della peste bubonica.*

Animali inoculati	Data dell'inoculazione	Animali dai quali si è preso il materiale per l'inoculazione	Qualità del materiale inoculato	Numero dei passaggi attraverso i gangli linfatici	Quantità della coltura inoculata	Esito della inoculazione
Cavia 33ª. .	12 settem. 1897	Dalla cavia 28ª	Coltura di 3 giorni dalla *milza*.		Un'ansa di coltura in agar.	+ dopo 7 giorni
Cavia 34ª. .	Id.	Id.	Coltura di 3 giorni dai *gangli*.	5° pass.	Id.	Vive
Cavia 35ª. .	23 settem. 1897	Dalla cavia 30ª	Coltura di 3 giorni dalla *milza*.		Un'ansa di coltura in agar.	+ dopo 8 giorni
Cavia 36ª. .	Id.	Id.	Coltura di 3 giorni dai *gangli*.	5° pass.	Id.	Vive

Da tali tabelle risulta adunque che il bacillo della peste, nei passaggi consecutivi attraverso i gangli linfatici, gradatamente si attenua.

Negli animali che muoiono con ritardo si constata già, fin dai primi giorni dopo l'inoculazione, lieve edema locale, e tumefazione dei gangli linfatici vicini; è solo negli ultimi giorni che si rendono manifesti i disturbi generali arrecati dall'infezione: l'animale non mangia più, i suoi movimenti sono lenti, i fatti di reazione locale e l'ingrossamento gangliare si fanno più intensi, sino a che sopravviene la morte.

All'autopsia si constata edema nel punto d'inoculazione, tumefazione notevole dei gangli inguinali e dei gangli lombari; meno accentuata è la tumefazione dei gangli a distanza. Tanto nelle glandole linfatiche, specie in quelle vicine, quanto nella milza si rinvengono numerosi bacilli; nel sangue invece si trovano solo pochi germi, e talvolta non si riscontrano punto.

È però da notarsi che mentre le colonie, ottenute dalla milza e dall'edema dal punto d'inoculazione, si presentano sotto forma di piccoli punti biancastri, ben circoscritti, le colonie che si ricavano dai gangli specialmente dopo vari passaggi, si presentano sovente più dense e più espanse, e mostrano un più rigoglioso sviluppo. I bacilli però, che li compongono, presentano la loro forma caratteristica.

Yersin [1] ha già richiamato l'attenzione su queste particolarità nell'aspetto delle colonie atipiche, dimostrando come esse presentino una virulenza minore delle altre colonie, poichè uccidono le cavie dopo un tempo assai lungo, talvolta anzi non ne determinano la morte. Tali colonie sono state da Yersin ricavate frequentemente dalla polpa dei buboni, talvolta anche dal sangue.

Si può quindi con molta probabilità ammettere che la presenza di simili colonie in numero abbastanza considerevole nelle colture ricavate dai gangli, sia dovuta all'attenuazione subita in tali organi dai bacilli della peste.

Come per tutti gli altri microrganismi, fin qui studiati, non si sono, nemmeno nelle colture gangliari del bacillo della peste, riscontrate importanti modificazioni morfologiche.

---

[1] *La peste bubonique à Hong-Kong*. Annales de l'Institut Pasteur, t. VIII, 1894, pag. 662.

f) Tubercolosi.

La tubercolosi si presenta assai bene per le nostre ricerche, come quella infezione che, a preferenza di tutte le altre, si diffonde lentamente nell'organismo animale, e predilige le vie linfatiche.

È chiaro quindi che i gangli linfatici possono, più agevolmente che nelle altre infezioni, esercitare la loro influenza sui bacilli tubercolari.

Ed invero i risultati ottenuti confermano la detta ipotesi.

Nelle nostre esperienze siamo partiti da colture in agar di tubercolosi umana abbastanza virulente. Con $^1/_8$ di cc. di tale coltura, emulsionata in 10 cc. di acqua distillata e sterilizzata, si sono inoculate nel cellulare sottocutaneo delle cavie, le quali sono morte in media 45-60 giorni dopo l'inoculazione, in istato profondamente cachettico.

Da ciascun animale si è fatta con il solito processo una pappa in un po' di soluzione fisiologica di cloruro sodico tanto dai gangli (sia vicini al punto d'inoculazione, sia distanti), quanto dalla milza, come quell'organo in cui si sa che il bacillo tubercolare non subisce attenuazione di sorta; avendo cura di eseguire lo spappolamento dei detti organi in uguale quantità di soluzione di cloruro sodico.

Fatti dei preparati da un'ansa della pappa dei gangli e di quella della milza, non si sono riscontrate notevoli differenze tra il numero dei bacilli tubercolari esistenti nella milza, e quello dei bacilli esistenti nelle glandole linfatiche. Con una stessa quantità delle dette emulsioni si sono inoculate per la via sottocutanea delle cavie di peso presso a poco uguale.

I risultati ottenuti si possono rilevare dalla seguente tabella:

TABELLA X — *Esperienze eseguite con il bacillo della tubercolosi.*

Animali inoculati	Data dell'inoculazione	Animali dai quali si è preso il materiale per l'inoculazione	Qualità del materiale inoculato	Numero dei passaggi attraverso i gangli linfatici	Quantità della coltura inoculata	Esito della inoculazione
Cavia A. .	18 settem. 1897	Da cavia inoculata con $^1/_3$ di cc. di emulsione di coltura in agar, e morta dopo 45 giorni.	Pappa di *milza*		1 cc.	+ dopo 50 giorni
Cavia B. .	Id.	Id.	Pappa di *gangli*	1° pass.	Id.	+ dopo 60 giorni
Cavia C. .	30 settem. 1897	Da cavia inoculata con $^1/_3$ di cc. di emulsione di coltura in agar, e morta dopo 60 giorni.	Pappa di *milza*		1 cc.	+ dopo 52 giorni
Cavia D. .	Id.	Id.	Pappa di *gangli*	1° pass.	Id.	+ dopo 69 giorni
Cavia E. .	1° ottobre 1897	Da cavia inoculata con $^1/_3$ di cc. di emulsione di coltura in agar, e morta dopo 30 giorni.	Pappa di *milza*		1 cc	+ dopo 27 giorni
Cavia F. .	Id.	Id.	Pappa di *gangli*	1° pass.	Id.	+ dopo 32 giorni

Segue TABELLA X — *Esperienze eseguite con il bacillo della tubercolosi.*

Animali inoculati	Data dell'inoculazione	Animali dai quali si è preso il materiale per l'inoculazione	Qualità del materiale inoculato	Numero dei passaggi attraverso i gangli linfatici	Quantità della coltura inoculata	Esito della inoculazione
Cavia G . .	28 ottobre 1897	Dalla cavia E	Pappa di *milza*		1 cc.	+ dopo 20 giorni
Cavia H . .	Id.	Id.	Pappa di *gangli*	1° pass.	Id.	+ dopo 23 giorni
Cavia I . .	2 novem. 1897	Dalla cavia F	Pappa di *milza*		1 cc.	+ dopo 22 giorni
Cavia K . .	Id.	Id.	Pappa di *gangli*	2° pass.	Id.	+ dopo 2 mesi
Cavia L . .	7 novem. 1897	Dalla cavia A	Pappa di *milza*		1 cc.	+ dopo 60 giorni
Cavia M . .	Id.	Id.	Pappa di *gangli*	1° pass.	Id.	Id.
Cavia N . .	18 novem. 1897	Dalla cavia B	Pappa di *milza*		1 cc.	+ dopo 42 giorni
Cavia O . .	Id.	Id.	Pappa di *gangli*	2° pass.	Id.	+ dopo 3 mesi

Segue TABELLA X — *Esperienze eseguite con il bacillo della tubercolosi.*

Animali inoculati	Data dell'inoculazione	Animali dai quali si è preso il materiale per l'inoculazione	Qualità del materiale inoculato	Numero dei passaggi attraverso i gangli linfatici	Quantità della coltura inoculata	Esito della inoculazione
Cavia P . .	23 novem. 1898	Da cavia inoculata con 1/8 di cc. di emulsione di coltura in agar, e morta dopo 64 giorni.	Pappa di *milza*		1 cc.	+ dopo 3[illegible] giorni
Cavia Q . .	Id.	Id.	Pappa di *gangli*	1° pass.	Id.	+ dopo 45 giorni
Cavia R . .	8 dicem. 1897	Dalla cavia D	Pappa di *milza*		1 cc.	+ dopo 63 giorni
Cavia S . .	Id.	Id.	Pappa di *gangli*	2° pass.	Id.	+ dopo 72 giorni
Cavia T . .	28 dicem. 1897	Dalla cavia P	Pappa di *milza*		1 cc.	+ dopo 33 giorni
Cavia U . .	Id.	Id.	Pappa di *gangli*	1° pass.	Id.	+ dopo 45 giorni
Cavia X . .	30 dicem. 1897	Dalla cavia N	Pappa di *milza*		1 cc.	+ dopo 53 giorni
Cavia Y . .	Id.	Id.	Pappa di *gangli*	1° pass.	Id.	+ dopo 75 giorni

Segue Tabella X — *Esperienze eseguite con il bacillo della tubercolosi.*

Animali inoculati	Data dell'inoculazione	Animali dai quali si è preso il materiale per l'inoculazione	Qualità del materiale inoculato	Numero dei passaggi attraverso i gangli linfatici	Quantità della coltura inoculata	Esito della inoculazione
Cavia V . .	3 gennaio 1897	Della cavia K	Pappa di *milza*		1 cc.	+ dopo 3 mesi
Cavia Z . .	Id	Id.	Pappa di *gangli*	3° pass.	Id.	Vive (5 novem. 1897)
Cavia A'. .	7 gennaio 1897	Dalla cavia Q	Pappa di *milza*		1 cc.	+ dopo 45 giorni
Cavia B'. .	Id.	Id.	Pappa di *gangli*	2° pass.	Id.	+ dopo 3 mesi
Cavia C'. .	12 febbr. 1897	Dalla cavia U	Pappa di *milza*		1 cc.	+ dopo 2 mesi e mezzo
Cavia D'. .	Id.	Id.	Pappa di *gangli*	2° pass.	Id.	Vive (10 ottobre 1897)
Cavia E'. .	18 febbr. 1897	Dalla cavia O	Pappa di *milza*		1 cc.	+ dopo 3 mesi e 21 giorni
Cavia F'. .	Id.	Id.	Pappa di *gangli*	3° pass.	Id.	Vive (15 ottobre 1897)

Segue TABELLA X — *Esperienze eseguite con il bacillo della tubercolosi.*

Animali inoculati	Data dell'inoculazione	Animali dai quali si è preso il materiale per l'inoculazione	Qualità del materiale inoculato	Numero dei passaggi attraverso i gangli linfatici	Quantità della coltura inoculata	Esito della inoculazione
Cavia G'. .	19 febbr. 1897	Dalla cavia S	Pappa di *milza*		1 cc.	+ dopo 3 mesi
Cavia H' .	Id.	Id.	Pappa di *gangli*	3° pass.	Id.	Vive (5 novem. 1897)
Cavia I' . .	22 febbr. 1897	Dalla cavia A'	Pappa di *milza*		1 cc.	+ dopo 30 giorni
Cavia K' .		Id.	Pappa di *gangli*	1° pass.	Id.	+ dopo 55 giorni
Cavia L'. .	14 marzo 1897	Dalla cavia Y	Pappa di *milza*		1 cc.	+ dopo 82 giorni
Cavia M'. .	Id.	Id.	Pappa di *gangli*	2° pass.	Id.	+ dopo 3 mesi
Cavia N'. .	7 aprile 1897	Dalla cavia B'	Pappa di *milza*		1 cc.	+ dopo 3 mesi e 28 giorni
Cavia O'. .	Id.	Id.	Pappa di *gangli*	5° pass.	Id.	Vive (5 novem. 1897)

Segue TABELLA X — *Esperienze eseguite con il bacillo della tubercolosi.*

Animali inoculati	Data dell'inoculazione	Animali dai quali si è preso il materiale per l'inoculazione	Qualità del materiale inoculato	Numero dei passaggi attraverso i gangli linfatici	Quantità della coltura inoculata	Esito della inoculazione
Cavia P'. .	19 aprile 1897	Dalla cavia K'	Pappa di *milza*		1 cc.	+ dopo 69 giorni
Cavia Q'. .	Id.	Id.	Pappa di *gangli*	2° pass.	Id.	+ dopo 3 mesi e 5 giorni
Cavia R'. .	14 aprile 1897	Dalla cavia M'	Pappa di *milza*		1 cc.	+ dopo 2 mesi e 16 giorni
Cavia S'. .	Id.	Id.	Pappa di *gangli*	3° pass.	Id.	Vive (5 novem. 1897)
Cavia T'. .	24 luglio 1897	Dalla cavia Q'	Pappa di *milza*		1 cc.	+ dopo 2 mesi
Cavia U'. .	Id.	Id.	Pappa di *gangli*	3° pass.	Id.	Vive (5 novem. 1897)

Risulta dalle dette esperienze che anche fin dai primi passaggi, a parità di condizioni, muoiono più presto gli animali inoculati con la milza, anzichè quelli inoculati con gangli.

L'attenuazione però dei bacilli tubercolari risalta in una maniera più evidente, dopo che i medesimi hanno subito per un tempo abbastanza lungo l'influenza del parenchima glandolare.

Si rileva infatti dalla precedente tabella che in generale dopo il terzo passaggio dei bacilli tubercolari attraverso i gangli linfatici delle cavie, mentre gli animali inoculati con milza muoiono in un tempo più o meno lungo, quelli al contrario inoculati con uguale quantità di emulsione dai gangli sopravvivono.

Alla necroscopia degli animali inoculati con gangli di 1° e di 2° passaggio si è osservata una notevole tumefazione di tutte le glandole linfatiche, sia sottocutanee che mesenteriche, molto più spiccata di quella che si osservava negli animali di controllo, inoculati con milza.

In quasi tutte le esperienze poi si è constatato un altro fatto degno di nota: nei preparati eseguiti dai gangli linfatici il numero dei bacilli è stato di molto superiore a quello riscontrato nella milza; in quest'organo anzi si è sovente constatata (e ciò per mezzo di numerosi preparati) l'assenza dei bacilli, e la presenza invece di granulazioni, tingibili solo con i metodi specifici di colorazioue dei bacilli di Koch, e spesso incluse nei globuli bianchi polinucleati.

Volendo assicurarmi dello stato dei bacilli tubercolari, dopo un più lungo soggiorno dei medesimi nei gangli linfatici, ho estirpato il giorno 15 luglio 1897 dalla cavia Z, inoculata il 3 gennaio, due gangli inguinali, vicini al punto d'inoculazione, e ne ho fatto dei preparati, nei quali si è notata una discreta quantità di bacilli tubercolari ben conservati.

Con 1 c. di pappa, fatta dai detti gangli, si sono inoculate due cavie le quali, benchè siano trascorsi già 4 mesi dall'inoculazione, non presentano alcun disturbo, anzi aumentano di peso; si osserva solo un ingrossamento, non molto accentuato, dei gangli linfatici vicini.

Gli animali che sono sopravvissuti alle inoculazioni con gangli di 2° o 3° passaggio, hanno tutti, 15-20 giorni dopo l'innesto, presentato una tumefazione più o meno accentuata dei gangli linfatici vicini non solo, ma anche di quelli a distanza. Tale ingrossamento dei gangli esiste tuttora, ed in alcuni animali è assai notevole.

La cute in corrispondenza del punto d'inoculazione non presenta ulcerazione di sorta, nè aderenza alcuna con i gangli sottostanti, i quali sono nettamente spostabili.

Degli animali sopravvissuti qualcuno durante il 1° mese dall'inocu-

lazione ha presentato diminuzione del proprio peso; in seguito però questo è aumentato, e gli animali presentano, si può dire, lo stesso aspetto di animali normali.

Uccidendo pertanto due di queste cavie (D′ ed F′) 8 mesi circa dopo l'inoculazione, si è constatato un ingrossamento assai considerevole dei gangli vicini; gangli a distanza, sottocutanei e mesenterici, anche essi ingrossati e con tubercoli calcificati, tanto da stridere sotto il coltello; milza e fegato relativamente non molto ingrossati, e disseminati di noduli in parte calcificati. Si sono riscontrati dei tubercoli confluenti anche al polmone, in gran parte però calcificati al punto da non permetterne la sezione con bisturi.

Malgrado una tubercolosi così diffusa la nutrizione generale degli animali, come pure il peso, erano benissimo conservati.

All'esame microscopico si sono nei gangli linfatici rinvenuti rarissimi bacilli tubercolari, abbastanza ben conservati; nella milza si sono riscontrati dei granuli, e, non in tutti i preparati, qualche raro bacillo.

Oltre le dette esperienze si sono praticate delle inoculazioni di bacilli tubercolari anche nei cani, appunto per studiare le modificazioni subite dei bacilli tubercolari nei gangli linfatici di animali meno sensibili delle cavie alla tubercolosi.

I cani, inoculati con la tubercolosi di cui ci siamo serviti nelle precedenti esperienze, cioè con tubercolosi umana, hanno presentato solo un'ulcerazione locale, e nessun altro disturbo.

Uccidendo due di detti animali uno dopo 15 giorni, l'altro dopo un mese, si sono riscontrati i gangli vicini al punto d'inoculazione alquanto tumefatti, nulla di notevole negli altri organi. Tuttavia all'esame microscopico, tanto nei gangli, quanto nella milza, molto più abbondantemente però nei primi, si sono rinvenuti i bacilli tubercolari.

Di tre cavie, inoculate due con pappa di gangli ed una con uguale quantità di pappa di milza, è morta solo quest'ultima dopo 20 giorni. Le altre due non hanno presentato disturbo alcuno, e nemmeno diminuzione di peso. Una di tali cavie è stata uccisa 21 giorni dopo l'inoculazione. Alla necroscopia si è solo constatata lieve tumefazione dei gangli linfatici vicini al punto d'inoculazione; la milza, il fegato e gli altri organi perfettamente normali. Solo nei gangli si rinvennero bacilli tubercolari in quantità piuttosto scarsa.

Da quanto abbiamo detto io credo che si possa affermare che il bacillo tubercolare, nei passaggi attraverso i gangli linfatici degli animali, tanto di quelli molto recettivi, quanto di quelli poco sensibili all'infezione, si attenua notevolmente, in guisa tale da determinare negli animali oltremodo recettivi, quali le cavie, una forma attenuata

di tubercolosi, con prevalente localizzazíone nel sistema gangliare linfatico.

Tale asserzione, dedotta dai fatti sperimentali, è ancora confermata dai dati clinici.

Si ammette oggi che la scrofola, il linfatismo degli antichi, le adenopatie tubercolari, non sieno altro che manifestazioni di una forma attenuata d'infezione tubercolare, con prevalente localizzazione alle glandole linfatiche.

Per spiegare tale forma di tubercolosi si sono emesse varie ipotesi. Il Verneuil,[1] il Leloir,[2] il Wynokowüz,[3] credono che ciò dipenda dal numero piuttosto scarso di bacilli, che si contengono nel sistema gangliare linfatico di tali individui, affetti da adenopatie tubercolari.

Il Leloir[4] ed il Poisson[5] ammettono che vi contribuiscano altri fattori, come la via attraverso la quale avviene l'inoculazione, (via endermica, sottocutanea, delle sierose, venosa), la resistenza dell'organismo inoculato, ed altre condizioni inerenti all'organismo stesso.

Certamente tali condizioni influiscono sul decorso del processo tubercolare, però tutte le ipotesi accennate sono insufficienti per spiegare l'evoluzione delle dette forme di tubercolosi ganglionare.

L'Arloing,[6] come aveva già in parte anche ammesso Verneuil,[7] crede che si tratti in simili casi di un'attenuazione reale della virulenza del bacillo tubercolare: egli infatti potè constatare che i frammenti di gangli di individui scrofolosi, inoculati nel cellulare sottocutaneo o nel peritoneo dei conigli, non determinano lesioni tubercolari; se però essi si inoculano a delle cavie, queste contraggono la tubercolosi. Sostiene quindi che la scrofola sia una tubercolosi attenuata non solo, ma che l'attenuazione sia *profonda* e *persistente*.

Il Noçard[8] però, avendo ripetute le esperienze dell'Arloing, insiste sulla quistione del numero, e crede che i diversi effetti causati dall'inoculazione dei prodotti tubercolari propriamente detti, e di quelli scrofolosi, siano

[1] *Hypertrophie simple des ganglions*. Gaz. hebd., 1853.

[2] *De la scrofule et de la tuberculose étudiées au point de vue dermatologique*. Bull. méd, 1888.

[3] *Ueber den Einfluss der quantität der verimpften Tuberkel-bacillen auf den Verlauf der Tuberkulose bei Kaninchen und meerschweinchen*. Münch. med. Woch., 1890.

[4] Loc cit.

[5] Loc. cit.

[6] *Essai sur la différenciation expérimentale de la scrofule et de la tuberculose humaines*. Revue de médecine, 1887, pag. 97.

[7] Loc. cit.

[8] Cit. da STRAUSS. *La tuberculose et son bacille*. Paris, 1895.

dovuti semplicemente alla piccola quantità di bacilli tubercolari, esistenti nei prodotti scrofolosi.

Egli nelle sue esperienze è riuscito, per mezzo delle inoculazioni in serie nei conigli, a rendere virulenti per questi ultimi dei prodotti di tubercolosi ganglionare, che prima erano poco virulenti.

Nelle mie ricerche ho potuto però notare, come più sopra si è accennato, che la quantità dei bacilli tubercolari, rinvenuti nei gangli linfatici, non solo di 1°, ma anche di 2° e di 3° passaggio, come pure in quelli degli animali sopravvissuti, è abbastanza più rilevante del numero dei bacilli riscontrati nella milza, e tuttavia, inoculando a delle cavie un'uguale quantità di pappa di milza e di gangli, e praticando sempre gl'innesti nel cellulare sottocutaneo, si è notato che gli animali, inoculati con gangli, o muoiono un certo tempo dopo di quelli inoculati con milza, o sopravvivono.

È necessario quindi ammettere che in simili casi si tratti di una attenuazione reale subìta dal virus tubercolare, il che del resto è altresì confermato dall'avere, anche per altri batteri patogeni, constatato una sensibile diminuzione nella loro virulenza, in seguito al soggiorno più o meno prolungato nel sistema gangliare linfatico.

Recentemente il Rosa [1] studiando gli effetti delle inoculazioni nei conigli, di masse caseose sterilizzate, ha riscontrato che, mentre al solito le colture sterilizzate di bacilli tubercolari determinano la morte degli animali con le lesioni proprie della necrotubercolosi, le inoculazioni delle masse caseose, ricavate dalle glandole linfatiche, riescono completamente innocue. Il Rosa ammette quindi che il bacillo della tubercolosi abbia nelle glandole linfatiche subìto un'attenuazione.

La scrofola sarebbe adunque una forma mite di tubercolosi, la cui evoluzione lenta e la cui benignità sarebbero sopratutto dovute alla influenza attenuatrice, esercitata dai gangli linfatici sul virus tubercolare.

La quantità dei bacilli tubercolari che penetrano nell'organismo, contribuisce forse a renderne più mite il decorso, ma ciò per il semplice fatto che il virus tubercolare, avendo bisogno di un tempo maggiore che gli altri virus per diffondersi nell'organismo, specie se in piccola quantità, subisce più a lungo l'influenza del parenchima glandolare, per cui l'attenuazione sarà più notevole e più persistente.

Ed è pure sotto questo punto di vista che si dovrebbe considerare

---

[1] *Effetti delle iniezioni endovenose nei conigli di masse caseose sterilizzate.* Il Policlinico, anno IV, n. 15, pag. 368.

l' influenza della via d' inoculazione sul decorso del processo tubercolare: quelle vie infatti attraverso le quali il virus può in massima parte e più direttamente penetrare nel sistema linfatico, come per esempio la via endermica, devono certamente rendere più lento ed anche più mite il decorso della tubercolosi, perchè da una parte ritardano la diffusione dei bacilli nell'organismo, dall'altra, prolungando il soggiorno del virus nei gangli linfatici, ne aumentano l' attenuazione.

III.

Considerazioni sul meccanismo dell' attenuazione dei batteri nei gangli linfatici.

Con quale meccanismo si produca l'attenuazione dei batteri patogeni nei gangli linfatici è difficile il precisarlo: il parenchima glandolare linfatico, privo di vita, come si è potuto vedere dalle esperienze suesposte, può esercitare qualche influenza su tale fenomeno; però il vero fattore della detta attenuazione risiede nel parenchima glandolare vivente, probabilmente in un' influenza bio-chimica da esso esercitata sui microrganismi che rinserra nelle sue maglie.

Tale osservazione è stata confermata dall' esame istologico delle glandole linfatiche.

In tutte le ricerche eseguite, l'osservazione microscopica dei tagli nei gangli linfatici ha mostrato, come già si è accennato parlando dell' infezione carbonchiosa, che, quando l' animale muore in breve tempo, i batteri, specialmente quelli che agiscono più per infezione che per intossicazione, quali i bacilli del carbonchio, lo pneumococco, ed anche i bacilli della peste, si trovano in gran numero nei vasi sanguigni, e solo pochi se ne riscontrano negli interstizi connettivali del parenchima glandolare. Nelle infezioni piuttosto lente, negli animali cioè che muoiono tardivamente, e talvolta anche nelle glandole linfatiche degli animali morti senza ritardo, tenute per un certo tempo a 37° C., si nota il fatto opposto: la quasi completa scomparsa dei microrganismi dal sangue, e la presenza di numerosi germi negli interstizi connettivali.

Tale fatto si poteva del resto intuire dall' avere nelle esperienze riguardanti la persistenza dei batteri nei gangli linfatici degli animali che sopravvivono all' inoculazione di tali germi, ricavato dei microrganismi, ed in numero notevole dalle glandole linfatiche, senza che nel sangue si rinvenisse germe alcuno.

Si può quindi ammettere che l'attenuazione dei batteri nei gangli linfatici si effettui a preferenza quando tali microrganismi oltrepassano la parete dei capillari sanguigni, e vengono in diretto contatto con i succhi e con gli elementi istologici propri del parenchima glandolare.

Si è voluto inoltre indagare se le colture gangliari attenuate avessero proprietà immunizzanti.

A tale scopo gli animali, sopravvissuti alle iniezioni di dette colture, si sono dopo qualche tempo (15-30 giorni) tornati ad inoculare con colture virulente di quei medesimi germi. Tali animali però, inoculati con la dose minima letale, sono morti senza presentare alcun ritardo.

Le colture gangliari attenuate, adunque, dei vari microrganismi su cui si è sperimentato, non esercitano sugli animali potere immunizzante.

IV.

Conclusioni e considerazioni generali.

Riassumendo i risultati delle varie esperienze eseguite sul comportamento dei gangli linfatici nelle infezioni, si possono stabilire le conclusioni seguenti:

1° Quando l'organismo si rimette da una infezione, i vari organi e tessuti dell'economia si liberano ben presto dei batteri che li hanno invasi; i gangli linfatici però, a differenza di qualunque altro organo, godono delle proprietà di trattenere per un tempo abbastanza lungo i batteri specifici di quella data infezione.

Anche i batteri saprofiti, inoculati nel cellulare sottocutaneo degli animali (cavie), scompaiono dopo alquanti giorni dai vari organi e tessuti, e si conservano invece per un tempo più lungo nelle sole glandole linfatiche.

2° I gangli linfatici, oltre la proprietà di trattenere i microbi che invadono l'organismo, hanno altresì il potere di modificare notevolmente la virulenza dei batteri che essi rinserrano nelle loro maglie, attenuazione che riesce tanto più profonda e persistente, quanto più lungo è il soggiorno dei microrganismi nei gangli linfatici.

Essa è probabilmente determinata da un'azione bio-chimica esercitata sui detti microbi dagli umori e dagli elementi istologici, propri del parènchima glandolare.

3° Nella lotta che l'organismo continuamente sostiene contro i batteri patogeni, che dapertutto lo circondano, tra i mezzi generali

di difesa che esso possiede, oltre il potere fagocitico degli elementi cellulari, ed il potere battericida degli umori, è da aggiungerne un terzo, già intuito dai patologi, ma non esattamente interpetrato, nè sperimentalmente dimostrato, quello cioè del sistema gangliare linfatico di trattenere ed attenuare i microrganismi patogeni.

I risultati ottenuti dalle ricerche sul comportamento in genere dei gangli linfatici rispetto ai microrganismi tanto negli animali sani, [1] quanto nelle infezioni, si completano a vicenda.

Possiamo infatti da una parte affermare che oltre i fattori già invocati per spiegare la presenza di microrganismi nei gangli linfatici degli animali normali, ne esiste un altro, non meno importante, la persistenza cioè dei batteri nelle dette glandole, in seguito a pregresse infezioni; d' altra parte l'attenuazione dei batteri nei gangli linfatici ci spiega come tali germi possano albergare per lungo tempo nell'organismo, senza determinare alcun disturbo apprezzabile.

Da tali fatti emergono delle considerazioni di molto interesse, non solo sull' evoluzione, ma anche sull'etiologia delle infezioni, e precisamente di quelle che vanno sotto il nome di auto-infezioni.

Tale concetto, appena accennato nella prima parte del presente lavoro, merita qui di essere più dettagliatamente trattato.

Il Verneuil e lo Jaccoud sono stati i più caldi sostenitori della teoria delle auto-infezioni, il primo basandosi sulla geniale teoria del microbismo latente, il secondo creando la dottrina del *dualismo etiologico*, [2] ammettendo cioè due specie d'infezione, una *estrinseca*, determinata dalla penetrazione dei germi dall' esterno, un' altra *intrinseca*, determinata dai germi esistenti nell'organismo.

Io non m'intratterò a parlare dei numerosi fatti clinici, sui quali i dotti autori si sono basati per fondare le anzidette due teorie. Basta consultare i lavori del Verneuil, [3] e le mirabili conferenze dello Jaccoud su tale ar-

---

[1] Vedi Parte I: *Parassitismo microbico latente nei gangli linfatici normali.* Questi Annali; Vol. VII, fasc. III, 1897.

[2] *Les maladies infectieuses*, Paris, 1883.

Leçon d'ouverture du cours de clinique médicale de la Pitié. - Sem. méd., 1883, pag. 325.

Leçon du 13 novembre 1883. - Clinique médicale de la Pitié, 1883-1884, pag. 23.

[3] *Du paludisme* — Revue de Chirurgie; 1880 et 1882.

De l'auto-inoculation traumatique — Revue de Chirurgie; 1883.

De l'auto-inoculation — Association franç. pour l'avancement des sciences. Congrès de Rouen; avril, 1884.

Discussion à l'Acad. Méd. sur les microbes et ptomaïnes — 23 fév. 1886.

gomento,[1] per restare, direi quasi, affascinati dalle dette dottrine, e formarsi la piu profonda convinzione che in molti casi di morbi infettivi, non si può menomamente invocare un'origine esterna dell'infezione, ma è necessario ammettere che gli agenti specifici della medesima preesistessero allo stato latente o d'innocuità nell'organismo; tali infezioni, come asserisce lo Jaccoud « *naissent dans l'organisme et de l'organisme par autogenèse, elles sont en nous, elles naissent de nous.* »[2]

Secondo lo Jaccoud i microrganismi patogeni, quali gli stafilococchi, gli streptococchi, gli pneumococchi, il bacterium coli, il bacillo del tifo, quello della tubercolosi, quello della difterite, ecc., possono penetrare nel nostro organismo senza determinare malattia di sorta. Tale penetrazione costituirebbe un'infezione virtuale, la quale può anche in prosieguo non arrecare alcun disturbo; a volte però per una causa occasionale qualunque i detti germi, esistenti nell'organismo, possono riacquistare in parte la loro virulenza, ovvero, pur restando attenuati, trovando però nell'affievolita resistenza dell'organismo condizioni più favorevoli al loro sviluppo, diffondersi nei vari organi, e determinare l'infezione.

Ad analoghe considerazioni perviene lo Sterling[3] nei suoi studi sull'auto infezione, facendo nettamente spiccare la differenza esistente tra contagio ed infezione, dimostrando come sovente il contagio, al quale di continuo l'organismo si trova esposto, non è seguito dall'infezione; questa invece può manifestarsi dopo un periodo di tempo più o meno lungo, sotto l'influenza di una qualsiasi di quelle cause così dette predisponenti.

Un'esatta dimostrazione sperimentale però di tali fatti non si era mai ottenuta, ed il meccanismo intimo, per il quale i germi, penetrati nell'organismo vi restavano allo stato d'innocuità, era sconosciuto; le osservazioni batteriologiche anzi tendevano a provare l'assoluta sterilità dei vari organi e tessuti dell'economia.

La presenza di microrganismi nei gangli linfatici, e la dimostrazione delle proprietà di cui godono tali glandole di fronte ai batteri, rischiara quei punti, finora oscuri, delle esposte teorie.

---

[1] Lavori citati.

Leçon du 9 février 1886 — Clinique méd. de la Pitiè; 1885-1886; p. 94.

Leçon du 22 mai 1886 — Ibid.; 1886-1887; p. 162.

Leçon du 9 novembre 1886 — Ibid.; p. 20.

Sur la pneumonie aiguë — Semaine méd.; 1887; p. 187.

Sur l'origine hospitalière de la phtisie pulmonaire — Semaine méd; 1896; p. 44 et 59.

De l'étiologie dans les maladies microbiennes — Semaine méd.; 1896; p. 461.

[2] *De l'étiologie dans les maladies microbiennes* — Loc. cit.

[3] *Sull'auto-infezione* — V. Supplemento al Policlinico; anno 1897; n. 33; p. 777.

I germi patogeni infatti, penetrando nell'organismo, da una parte non possono facilmente diffondersi in esso, perchè arrestati dai gangli linfatici, dall'altra parte vengono quivi a subire un'attenuazione, la quale si fa sempre più intensa man mano che si prolunga il soggiorno nelle glandole linfatiche, per cui essi resterebbero nell'organismo allo stato, direi quasi, saprofitico.

Ciò però con molta probabilità avviene quando i batteri patogeni penetrano in quantità piuttosto scarsa nell'organismo, sia attraverso la superficie cutanea e mucosa intatte, sia attraverso le piccole discontinuità delle medesime, perchè in questi casi a preferenza i microrganismi si diffondono per le vie linfatiche, ed inoltre, essendo in scarso numero, possono più agevolmente essere trattenuti dai gangli linfatici.

Essi in tal guisa determinerebbero quell'infezione *virtuale* di cui parla lo Jaccoud, e resterebbero allo stato latente nelle glandole linfatiche. Se però la resistenza dell'organismo viene a diminuire, i detti germi potranno, e ciò in un periodo di tempo più o meno lontano dalla loro penetrazione, o riacquistare la perduta virulenza, o trovare delle condizioni molto favorevoli al loro sviluppo, moltiplicarsi e diffondersi nell'organismo, determinando così quella forma d'infezione che Jaccoud chiama *intrinseca*.

Nel caso invece che i batteri invadano in grande quantità l'organismo, come avviene quando in esso esistono vaste superficie di scontinuità, un buon numero si diffonderà per la via sanguigna, altri prenderanno la via dei linfatici, ed arriveranno ai gangli, dove non tutti, atteso il loro grande numero, potranno essere arrestati, per cui una buona quantità di microrganismi virulenti si disseminerà nel sangue e nei vari organi, determinando in questo caso l'altra varietà d'infezione, quella cioè *estrinseca*.

Anche sull'evoluzione delle malattie infettive il sistema linfatico esercita una indiscutibile influenza.

È noto infatti che quelle infezioni che prescelgono le vie linfatiche, quali ad esempio la tubercolosi, hanno un decorso molto più lento di quelle che si diffondono per le vie sanguigne; anzi tale fatto appunto indusse i patologi a considerare le glandole linfatiche come organi di arresto.

Le mie ricerche confermano con dati sperimentali tale ipotesi, dimostrando inoltre come la lentezza nel decorso delle accennate infezioni non sia semplicemente dovuta ad un ostacolo, per così dire meccanico, che incontrano i batteri nei gangli linfatici, ma ancora ad un'attenuazione più o meno sensibile, subìta nei detti organi dai microrganismi; e la prova sperimentale di ciò sta nel fatto che quando un microrga-

nismo, per quanto virulento, si inocula direttamente ed esclusivamente, nelle vie linfatiche, o non determina la morte degli animali, o la produce in un tempo molto più lungo di quello che occorrerebbe, se il detto virus venisse inoculato nel sangue.

Il comportamento infine del sistema glandolare linfatico rispetto ai microrganismi, può farci altresì meglio comprendere la maniera di prodursi delle ricadute e delle recidive.

Abbiamo dimostrato infatti, che dopo una data infezione, i microrganismi si possono conservare per un tempo assai lungo nei gangli linfatici, vitali sì, ma attenuati, scomparendo completamente dai medesimi dopo un tempo più o meno lungo.

Or è da supporre che se l'individuo, qualche tempo dopo essersi guarito da quella data infezione, si espone ad una qualsiasi causa che ne indebolisca i poteri di resistenza, debba anche venir meno la speciale attività biologica, che è spiegata dalla glandola linfatica sui germi che essa alberga. Per cui questi, già in via di attenuazione, possono riacquistare la primitiva virulenza; oppure, anche non riacquistandola, trovando però l'organismo indebolito, sono messi in grado di determinare una nuova infezione.

Valgono a conferma di tali fatti i numerosi casi clinici di ricadute e di recidive, nei quali è necessario ammettere che i germi della pregressa infezione sieno rimasti allo stato di latenza nell'organismo, per determinare i loro funesti effetti dopo un tempo più o meno lungo, e precisamente quando un trauma, un raffreddamento, una fatica esagerata, una qualsiasi causa occasionale, insomma, venga ad indebolire i poteri di resistenza organica.

Concludendo, adunque, io credo che al sistema glandolare linfatico debba attribuirsi nella dottrina dei morbi infettivi una rilevante importanza, poichè esso mentre da una parte è da considerarsi come mezzo di difesa dell'organismo contro i microbi invasori, dall'altra può anche costituire il punto di partenza di molte infezioni, la cui origine resta il più delle volte inesplicabile.

È appunto in queste proprietà del sistema gangliare linfatico che possiamo forse trovare la spiegazione di vari concetti alquanto oscuri di patologia; è appunto in esse che la teoria del parassitismo latente e quella delle auto-infezioni trovano una base sperimentale, ponendo nella sua vera luce il famoso aforisma dell'antica dottrina ippocratica sull'etiologia dei morbi: *Totus homo ex nativitate morbus est.*

Istituto d' Igiene della R. Università di Padova

LO STREPTOCOCCUS EQUI

RICERCHE SPERIMENTALI

DEI

Dottori ETTORE CAPPELLETTI e MICHELANGELO VIVALDI

Assistenti

I.

Queste nostre osservazioni sperimentali riguardano una malattia infettiva che colpisce frequentemente gli equini, la quale, se spesso decorre con chiara sintomatologia, può assumere talvolta parvenze cliniche diverse. Manca, in quest'ultimo caso, il criterio per un pronto e sicuro diagnostico e la profilassi viene quindi con incertezza applicata. Allora solo la batterioscopia può dimostrare che le forme gravi, svoltesi con nuovo ed insolito apparato di sintomi e le altre, decorrenti colla tipica fenomenologia, hanno un unico fattore etiologico, il quale modifica la propria biologia e pertanto la propria virulenza a seconda di determinate condizioni di tempo e di luogo. Ciò abbiamo noi potuto rilevare in una grave epidemia di *adenite equina* (*gourme* dei francesi) la quale infierì nei cavalli di alcune batterie d'artiglieria, stanziate nella città di Treviso.

La malattia iniziatasi nel gennaio decorso, persistette nel febbraio e marzo, colpendo 25 quadrupedi — di questi 13 guarirono, 12 vennero a morte. — Il Nocard [1] dimostra come la *gourme* si manifesti in vario modo. Egli dice: « il n'est pas d'exemple plus complet de la molteplicité des aspects cliniques que peut revetir une même infection. Exprimée seulement, en certains cas, par une éruption cutanée bénigne, elle se traduira dans d'autres par des catarrhes diffus des muqueuses ou par des foyers limités de suppuration, affectant les sièges les plus variés; dans certaines formes enfin, elle revêtira les caractères d'une septicemie maligne, à evolution rapide ».

[1] *Les maladies microbiennes des animaux.* — Paris, 1896.

Nel caso nostro, localizzazioni morbose, iniziatesi acutamente ora nell'apparato digerente ora nel respiratorio, diedero ben tosto manifestazioni generali (febbre elevatissima (41°) — tremori muscolari parziali o diffusi — iniezione delle mucose del naso, delle labbra, emorragie rettali, ecc.).

Le lesioni anatomiche vennero sempre riscontrate predominanti nel tubo gastro-enterico — mucosa dello stomaco e dell'intestino tumefatta, ricoperta di denso strato catarrale e qua e là sparsa di estese infiltrazioni emorragiche — il *colon fluttuante* spesso gangrenato. Nei polmoni, e più specialmente nei lobi superiori, focolai di bronco pneumonite, talora confluenti. Milza, aumentata di volume, con polpa molle, spappolabile, sede di emorragie. Fegato, parimenti ingrandito, torbido grasso. Congesti i reni, in particolar modo in corrispondenza delle piramidi — qua e là la sostanza corticale iniettata, con aree di degenerazione grassa. Sangue nero, piceo. Tumefatte le ghiandole del mesentere e quelle peribronchiali.

Il sangue del cuore, gli essudati pneumonici, il succo splenico, il contenuto intestinale di tre cavalli, morti acutamente, furono il materiale primo che abbiamo utilizzato per le nostre ricerche e che ci diede modo di stabilire che veramente trattavasi, nei casi citati, di *gourme*. Infatti nei vetrini, preparati col sangue e col succo splenico, abbiamo riscontrato la presenza esclusiva di piccoli cocchi, la maggior parte dispersi o appaiati, talora uniti in brevi catene. Questi stessi elementi abbiamo potuto riconoscere, quasi in predominio, nell'essudato polmonale e nel contenuto dell'intestino. Ad essi dovevamo pertanto attribuire l'etiologia delle forme infettive sviluppatesi; gli ulteriori sperimenti ed osservazioni ci dimostrarono che l'epidemia era dovuta allo *streptococcus equi*, scoperto dallo Schuetz, [1] illustrato dallo Sand e Jensen, [2] dal Poels, [3] dal Nocard, [4] e da altri.

E sulle proprietà biologiche di questo microrganismo vennero rivolte le nostre ricerche. Emergerà forse da esse se debbasi considerare questo germe come un'individualità a se o piuttosto come una varietà di quel gruppo, esteso, di streptococchi patogeni, nei quali vuolsi da molti riconoscere un unico tipo, che va modificando le sue proprietà a seconda del mezzo in cui agisce e di altre influenze.

---

[1] *Archiv. f. Thierheilk*, vol. XIV, 1888.
[2] *Zeits, f. Thierm*, vol. XXIII, 18:8.
[3] *Fortsch. der medicin.*, vol. VI, 1888.
[4] Loco citato.

II.

Nel sangue e negli essudati dei cavalli, morti acutamente di *gourme* come in quelli degli animali da laboratorio esperimentati, lo *streptococcus equi* si rivelò a noi sotto forma di cocchi, il più delle volte isolati, talora appaiati o disposti in brevi catene (4-6 elementi). La forma di ciascun elemento si presentò spesso rotonda, talvolta però leggermente ovale; in qualche caso, negli essudati e nelle colture artificiali si ebbe a notare una certa variabilità di dimensioni per la presenza di elementi alquanto più voluminosi fra mezzo ad altri più piccoli. Il microrganismo tende alla formazione di catene più o meno lunghe, quando viene coltivato artificialmente. Così notasi la presenza di quelle piuttosto brevi nelle colture in gelatina, agar, sulla patata, di altre lunghissime nelle colture in brodo (20-30-40 elementi in serie). Queste variazioni di disposizione abbiamo notato essere inerenti alla maggiore o minore virulenza del microrganismo.

Negli animali, morti acutamente, questo si trova nel sangue, nei parenchimi, negli essudati isolato e con poca tendenza all'aggruppamento in serie; in quelli, che soggiacciono a più lenta infezione, più facile è il formarsi di catene.

Queste poi si presentano più lunghe nelle colture vecchie anzichè nelle recenti. Questo fatto, che deve stare in relazione colla più o meno rapida e rigogliosa moltiplicazione dei germi, è comune per gli altri streptococchi e si avvera, non di rado, anche per il diplococco di Frânkel il quale va disponendosi in brevi catene quando perde della propria virulenza.

Per la colorazione dello *streptococcus equi*, sia per metterlo in evidenza nei tessuti, nel sangue che nelle colture, abbiamo adoperato i consueti metodi. Con facilità esso assume i colori d' anilina. Si tinge bene col Gram e col Weigert, proprietà che esso ha comune colla maggior parte degli streptococchi patogeni. È un microorganismo completamente immobile.

Lo abbiamo coltivato nei vari mezzi di nutrizione e qui riassumiamo i risultati ottenuti. È anerobio facoltativo. Cresce difficilmente a temperature inferiori a 20°, dà sviluppo più rigoglioso e rapido da 24° a 37°. Le colonie, cresciute in gelatina, si presentano minutissime, rotonde, dischiformi; vedute a piccolo ingrandimento sono a bordi netti, leggermente gialliccie, granulose; quelle in agar sono puntiformi ed assomigliano, ad occhio nudo, a piccole goccioline di rugiada. Nel siero di sangue lo streptococco dà una sottilissima pellicola grigiastra tra-

sparente, formata dalla confluenza di minutissime colonie; sulla patata si sviluppa con scarso rigoglio e senza speciali caratteri. Più tipica è la coltura in brodo che noi, per quante prove abbiamo fatto sia con materiale tolto dall'animale (sangue, succo splenico od essudato) sia con trappianti successivi, abbiamo veduto mantenersi costantemente uguale. Già sino dopo le 24 ore d'incubazione a 35°-37°, si nota che, mentre la parte superiore del brodo è completamente limpida, nel fondo della provetta va raccogliendosi la massa dei microorganismi sotto aspetto di fiocchi densi, bianco-grigiastri. Questi ulteriormente si fanno sempre più abbondanti in modo da occupare la parte più bassa della coltura come strato spesso, che, solo agitando il liquido, si solleva. L'aspetto della coltura in brodo dello streptococco equi, da noi studiato, s'avvicina di molto a quello dello streptococco piogene e dell'eresipela; solo forse potrà differenziarsi dalla maggiore densità e spessezza dei fiocchi che la coltura presenta in confronto di quella degli altri due microorganismi.

Non pare però a noi di dover dare una grande importanza a queste differenze poco spiccate, tanto più avendo spesso osservato come *streptococchi*, di varia provenienza, possano in simil modo comportarsi quando siano coltivati artificialmente, essendo che, sul maggiore o minor sviluppo di essi, può influire una leggera od eccessiva alcalinità del brodo.

Le colture, che noi abbiamo fatto nei soliti mezzi di nutrizione ed in altri, come, p. es., il latte, il siero albuminoide, il fucus non ci hanno dato dei caratteri importanti differenziali tra il modo di crescere dello *streptococcus equi* e quello dei più comuni streptococchi noti.

Abbiamo ricercato come questo microbio agisce nell'organismo degli animali; e molti furono gli esperimenti da noi fatti sui topolini bianchi, sulle cavie, sui conigli, adoperando per materiale d'innesto o la sostanza fresca presa da organi, da sangue, da essudati dei cavalli, morti spontaneamente o le colture in brodo recenti e vecchie.

Riassumiamo i reperti anatomici ed i risultati batterioscopici, nell'ordine con cui l'esperienze vennero fatte.

a) *Topolini*. — Questi piccoli animali si mostrano molto sensibili all'azione dello streptococco. Inoculati sotto cute con sangue o con essudato polmonale di cavallo, morto di *gourme*, soccombono in 4ª giornata, presentando le seguenti lesioni: essudazione grigiastra, molle, puriforme nella località d'innesto. Milza notevolmente aumentata di volume, nerastra — fegato congesto ed ingrandito — catarro diffuso dell'intestino — sangue fluido. Con successivi passaggi da topo a topo si ottiene, per un periodo abbastanza lungo, un virus fisso (morte degli animali in 3ª giornata) il quale però, in seguito, spontaneamente si attenua (morte

in 6^a–8ª giornata) per poi successivamente rinforzarsi; di ciò non abbiamo saputo darci ragione.

Adoperando, invece del materiale fresco proveniente da animale, le colture in brodo recenti, si provoca, anche con minime dosi ($^1/_{20}$ c.c) la morte dei topolini — ma questa avviene con un certo ritardo e si constatano allora all'autopsia predominanti i fatti locali (più estesa l'essudazione nella località d'inoculazione).

Il reperto batterioscopico nei topolini, che soggiacquero all'infezione sperimentale, fu costantemente il seguente: nel punto d'innesto streptococchi numerosissimi e a brevi catene, cocchi appaiati e dispersi; nella milza e nel sangue cocchi isolati od appaiati. Se però la morte avvenne con qualche ritardo, predominanti nel sangue e negli essudati le catene.

b) *Conigli.* — In questi animali abbiamo fatto inoculazione di materiale virulento sotto cute dell'orecchio, nel tessuto sottocutaneo del dorso, del ventre, nel peritoneo e nel torrente circolatorio. Il più delle volte si ebbe un'azione generale violenta; talvolta, quando si usarono colture attenuate, manifestazioni locali, che lentamente scomparvero.

Il materiale fresco (sangue, polpa splenica, esssudati tolti dal cavallo) per innesto sottocutaneo provocò sempre fenomeni d'infezione acutissima. Spesso dopo un'inalzamento della temperatura (40°.5–41°) si ebbe la morte dei conigli, quando non erano ancora trascorse le 24 ore della subita inoculazione.

In questi casi nulla di notevole notavasi nella località d'innesto; quivi invece, se la morte seguiva più tardi, si mostrava intensa reazione, rappresentata da esteso edema e da essudazione purulenta. Nell'uno e nell'altro caso poi la milza era voluminosissima, nerastra, con polpa molle, spappolabile, il fegato congesto, con aree di necrosi superficiale, l'intestino diffusamente iniettato; spesso iperemia ed edema acuto ed emorragie alle basi del polmone. Con successivi passaggi si potè rendere il materiale d'innesto eccessivamente virulento, cosicchè era sufficiente a dare acutamente la morte, anche in grossi conigli, una quantità tale quanta ne può stare sull'estrema punta di un sottilissimo ago. Ciò specialmente quando veniva adoperata l'essudazione fibrino purulenta della località d'innesto; il succo splenico e il sangue degli animali, morti in poche ore, davano l'infezione in altri con minor violenza ed usati in quantità maggiore. Infatti un ansa di platino di succo splenico o di sangue provocava la morte dei conigli innestati in 2^a, 3^a, 5^a. 6^a, 7^a giornata.

I risultati batterioscopici furono costantemente uguali: cocchi in

grandissima quantità nell'essudazione locale e disposti a piccole catene od appaiati; nel sangue e nella milza, in massima parte, appaiati.

I conigli, inoculati con materiale patologico nel peritoneo (1 piccolissima ansa di essudato in 1 c.c. d'acqua sterilizzata), morirono rapidissimamente (in meno di 24 ore o appena queste trascorse) presentando diffusa peritonite fibrino purulenta e le note alterazioni della milza e del fegato — reni congesti. In questi casi si rinvennero numerosissimi anche nel sangue i microrganismi, la maggior parte dispersi, non aggruppati.

Morte rapida si ebbe pure colle iniezioni intravenose (1 piccola ansa di platino di essudato in 1 cc. d'acqua sterile) e, oltre a congestione ed emorragie puntiformi nei polmoni e ad aree necrotiche nel fegato, oltre a tumore splenico notevole, si rilevarono degenerazione torbido-grassa della sostanza corticale del rene e iperemie delle piramidi.

Le colture recentissime, in brodo, dello streptococco provocarono nei conigli identici fenomeni e analoghe lesioni a quelle su descritte, anche adoperando dosi minime ($^1/_{20}$ — $^1/_{10}$ c.c). Resistettero invece gli animali alle iniezioni sottocutanee di colture vecchie, presentando, in qnesti casi, solo manifestazioni locali. Così infatti alcuni conigli, inoculati sotto cute dell'orecchio, come si fa per lo streptococco dell'eresipela, con colture che erano state 8-10 giorni in termostato a 37°, presentarono intenso calore, turgore e rossore della parte, fenomeni che rapidamente comparvero e persistettero intensi per due o tre giorni accompagnandosi ad inalzamento generale della temperatura, per svanire quindi lentamente.

Non si ebbe a notare formazione di flittene, bensì qualche piccolo focolaio purulento e considerevole dilatazione delle vene dell'orecchio. Le colture non recenti determinarono la morte dei conigli a dosi rilevanti e con grande ritardo.

c) *Cavie.* — Questi animali presentano una certa refrattarietà all'azione dello streptococcus equi. Inoculando, sotto cute, del materiale fresco virulento, in minime proporzioni (una piccolississima ansa di essudato in 1 c.c d'acqua sterilizzata) va manifestandosi un' edema locale che rapidamente scompare; adoperando invece maggior quantità di virus (due o tre anse di platino) si forma non di rado un ascesso che aumenta ed ulcera, dando esito a notevole quantità di pus tenue. Gli animali non si risentono molto nello stato generale. Avendo noi fatto dei preparati col pus, nei primi giorni di sua formazione, abbiamo constatato scarsi cocchi isolati ed alcuni entro i leucociti; questo fenomeno ulteriormente si rende più manifesto. Il microrganismo però

non ha perduto per questo delle sue attività patologiche perchè, avendo noi inoculato una piccolissima quantità di pus, quando in esso si constatava manifesta la fagocitosi, sotto cute ai topi, abbiamo in questi riprodotte le solite alterazioni, dovute allo streptococco, il quale abbiamo rinvenuto nel sangue e nei visceri e che si sviluppò rigoglioso nelle colture artificiali. Solo abbiamo notato una certa attenuazione nella virulenza; i topolini, inoculati col pus di cavia, morirono con tre o quattro giorni di ritardo in confronto dei controlli. Sembra quindi che nella cavia lo streptococcus equi, inoculato sotto cute, non agisca sullo stato generale perchè i leucociti oppongono valida barriera; la quale però non è tale da produrre in un tempo relativamente limitato (5–6 giorni), la perdita della vitalità e della virulenza del microrganismo. Attivo si mostra invece lo streptococco, quando venga inoculato nel peritoneo. Le cavie, in tal modo esperimentate e con dosi minime di essudato, preso da animale morto acutamente, soccombono in poche ore (24–30 ore) di peritonite acutissima.

In questi casi le anse intestinali si trovano agglutinate da essudato fibrinoso, la milza è enormemente aumentata di volume e nerastra, il fegato è congesto.

Nel sangue, nell'essudato peritoneale, nel succo splenico numerosissimi si riscontrano i cocchi.

Se però, invece degli essudati, si adoperano le culture pure e recenti di streptococco, le sudescritte lesioni mancano e le cavie, dopo passeggiero malessere, si rimettono completamente in salute.

Veduto come si comporta lo streptococcus equi nei vari animali di laboratorio, abbiamo istituito alcune ricerche per stabilire se è possibile e in qual modo conferire l'immunità all'infezione, da esso determinata. Anzitutto abbiamo osservato che quei conigli, che avevano sopravvissuto all'iniezione, di colture in brodo attenuate, sotto cute dell'orecchio, presentando solo lesioni localizzate e transitorie, inoculati successivamente con sangue o con essudato di determinata virulenza (uccidevano conigli controllo in 24–48 ore) resistevano senza apparenti molestie. Questa immunità acquisita però si rivelò di breve durata. Infatti i 4 conigli, da noi sperimentati, che si mostrarono refrattari all'innesto di materiale virulento dopo 10 giorni da che avevano superato la leggera prima infezione, soccombettero invece ad una seconda prova, praticata dopo 35 giorni. Morirono contemporaneamente ai controlli, nello spazio di 48 ore, presentando estesissimo edema locale, milza voluminosissima, nerastra, dura; fegato, reni congesti. Gli esami batterioscopici del sangue, dell'edema locale, del succo splenico furono positivi.

L'immunità quindi non è assoluta e non è duratura, potendo essa cessare per l'azione di uno streptococco di diversa attività, ciò che Marmoreck [1] ha osservato anche per lo streptococco piogene. Questo ci fu confermato da esperimenti ulteriori, coi quali abbiamo cercato di rendere immuni i conigli, inoculando ad essi dapprima minime quantità di colture in brodo attenuate di *streptococcus equi* ($^1/_{20}$ c.c), e in prosieguo dosi maggiori (1–2–3 c.c) per passare successivamente a colture virulenti ed a prodotti patologici, in cui vi era un esaltamento di virulenza. Anche nella serie di questi esperimenti abbiamo veduto che vi fu un limite di resistenza da parte dell'organismo animale e che solo, con una lunga e paziente preparazione, si potrà riescire allo scopo. I conigli, da noi sperimentati, se tollerarono, da ultimo, dosi relativamente grandi di colture in brodo virulenti (4–5 c.c) soggiacquero, talora con un ritardo in confronto dei controlli, all'innesto sottocutaneo di prodotti patologici, in cui il virus era nella massima attività. Gli stessi risultati abbiamo ottenuti seguendo il metodo di Roger, [2] preparando cioè gli animali con iniezione sottocutanea di brodi di coltura, portati a 120°.

Qualche prova abbiamo istituito per studiare se il siero di Marmorek spieghi influenza immunizzante verso lo *streptococcus equi* e quale sia la sua azione terapeutica quando l'infezione è già iniziata. I nostri esperimenti però sono limitati, avendo avuto a nostra disposizione pochissima quantità di siero, e in base ad essi, non possiamo venire, per ora, a conclusioni assolute.

1. Due conigli, del peso da 250 a 300 grammi, ricevono sotto cute, in giorni alterni, 4 iniezioni di siero Marmorek (1 c.c per volta). Presentano un leggero edema locale. Inoculati sotto cute, dopo due giorni dall'ultima iniezione preventiva, con minime quantità ($^1/_{10}$ c.c) di coltura virulenta di *streptococcus equi*, sopravvivono tre giorni al coniglio controllo. Nulla di notevole all'autopsia, se si eccettui un estesissimo edema nella località di innesto.

2. Due giovani conigli, del peso da 200 a 225 gr., vengono inoculati, sotto cute, con 1 c.c di siero Marmorek e immediatamente con $^1/_{20}$ c c coltura virulenta *streptococcus equi*.

Muoiono due giorni dopo il coniglio controllo.

Essi pure presentano diffuso edema gelatinoso nel punto d'innesto.

Alla necroscopia ed all'esame batterioscopico il solito reperto.

3. Due conigli, del peso da 320 a 350 gr., due ore dopo esser stati inoculati con cultura virulenta in brodo ($^1/_{20}$ c.c) di streptococco, subiscono,

[1] *Annales de l'Institut Pasteur*, 1895.

[2] Société de Biologie, 26 février et 30 mars 1895.

nella stessa località, un'iniezione di 1 c.c di siero Marmorek. Muoiono un giorno dopo il coniglio controllo, presentando le consuete alterazioni viscerali — meno esteso notasi l'edema nella località d'innesto in paragone degli altri conigli sopranominati. L'esame micro-batterioscopico rilevò grandissima quantità di cocchi appaiati e a piccole catene nel sangue, nei visceri e nella lesione locale.

Il siero di Marmorek avrebbe spiegato un'azione ritardatrice a quella diffusiva dello streptococco e forse l'edema locale esprime il tentativo di resistenza da parte dell'organismo.

Noi, del resto, abbiamo veduto costantemente alla diminuzione di virulenza del germe, corrispondere una maggiore reazione all'intorno del punto d'innesto.

III.

Alla conoscenza delle proprietà biologiche dello *streptococcus equi* interessa anche il modo suo di comportarsi di fronte agli agenti fisico chimici. E pertanto abbiamo esperimentato come modifichino la biologia di questo germe il contatto, più o meno lungo, con sostanze disinfettanti, l'essiccamento, per minor o maggior tempo protratto, la luce solare, l'elevata temperatura, la putrefazione.

a) Le sostanze disinfettanti, delle quali abbiamo studiato l'azione sullo streptococco, furono l'acido salicilico in soluzione al 3 °/oo, l'acido fenico all'1-2 °/o, il lysol Nava al 2 °/o, il sublimato corrosivo in soluzione semplice al 1/2 °/oo e con aggiunta del 5 °/oo di acido cloridrico.

Per queste ricerche, abbiamo adoperato delle fettuccie di seta sterilizzate a secco a 160°, lunghe 1 cm., larghe 1/2, sfrangiate ad una delle loro estremità.

Queste venivano infettate con succo di milza di topo albino o di coniglio, morti in seguito ad inoculazione sottocutanea di materiale molto virulento e reso tale per progressivi passaggi attraverso l'organismo animale. Dopocchè le fettuccie erano state a contatto del disinfettante per il tempo voluto, se si trattava di acido fenico, di acido salicilico, di lysol venivano agitate in acqua distillata e sterilizzata. Se invece si trattava di sublimato corrosivo, veniva questo neutralizzato aggiungendo all'acqua di lavaggio qualche goccia di solfuro d'ammonio. Eliminato in un modo o nell'altro il disinfettante, le fettuccie erano immerse in tubi contenenti 10 cc. di brodo nutritivo, i quali si tenevano, per 4 5 giorni, in termostato alla temperatura di 37°. Se, trascorso il tempo, non notavasi alcun sviluppo nei brodi di coltura si riteneva esser stato lo streptococco ucciso dalla sostanza antisettica. Avendo noi sempre operato con ogni cautela, non abbiamo mai dovuto lamentare inquinamenti per germi estranei, così che i brodi, dopo la

permanenza in termostato, o presentavano l'aspetto caratteristico della coltura di streptococco o per nulla si modificavano. Per maggior sicurezza poi e per avere un termine di confronto, non abbiamo trascurato di fare, ogni qualvolta si esperimentava l'azione d'un disinfettante, una prova di *controllo* immergendo in un tubo di brodo una delle listarelle infette, lavata precedentemente in abbondante acqua distillata sterilizzata. Dalle colture controllo si ebbe sempre sviluppo tipico di streptococco.

La temperatura delle soluzioni antisettiche e quella dell'ambiente oscillò, durante il periodo delle ricerche, fra 18° e 22°.

Riassumiamo in una tavola i risultati ottenuti e ripetutamente controllati:

NATURA E TITOLO della soluzione	DURATA D'AZIONE DEL DISINFETTANTE									
	5′	10′	15′	20′	25′	30′	35′	40′	45′	60′
Soluz. salicidica 3 °/₀₀	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—
Soluz. fenica 1 °/₀ . . .	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—
Soluz. fenica 2 °/₀ . . .	+	+	—	—	—	—				
Soluz. lysol 2 °/₀ . . .	+	—	—	—	—	—				
Soluz. sublim. 1/2 °/₀₀	+	+	+	+	—	—				
Soluz. sublim. 1/2 °/₀₀ Acido clorid. 5 °/₀₀	—	—	—	—	—	—				

Il segno + indica che si ebbe sviluppo nei brodi; il segno — che non si ebbe sviluppo.

b) Per studiare la resistenza delle *streptococcus equi* all'essicamento, abbiamo parimenti adoperato delle fettuccie di seta, sterili, simili a quelle che usammo per le precedenti esperienze ed infettate con succo di milza di topo albino (morto in terza giornata in seguito ad inoculazione sottocutanea di essudato locale di altro topo). Vennero esse collocate in capsule Petri sterili e queste alla lor volta, in un essicatore Scheibler ad acido solforico, tenuto, per tutta la durata della ricerca, entro un armadio, fuori dell'azione della luce. La temperatura della stanza durante il lungo periodo di osservazione (mesi 2 1/2) oscillò fra 15° e 27°. La vitalità e la virulenza del microrganismo, nei diversi periodi di essicamento, vennero studiate immergendo un piccolo frammento di seta in un tubo di brodo nutritivo e

inoculando un altro piccolo frammento, sotto cute, ad animale sensibile all' infezione (topo, coniglio). S' iniettarono anche talora negli animali le colture sviluppatesi dalle fettuccie immerse.

I risultati ottenuti furono i seguenti: sviluppo caratteristico in brodo a 37°, nello spazio di 24 ore, dopo 7, 14, 21 giorni di essiccamento, più lento e meno rigoglioso dopo 28, 45, 60 e perfino dopo 75 giorni. I topolini, inoculati colla seta, dopo 7, 14, 21 giorni di essiccamento, soccombettero; lo streptococco però, dopo il 28° giorno, perdette di attività per il il topo per mantenerla verso il coniglio e ciò anche dopo mesi 2 di essicamento. Passato questo periodo le colture, sviluppatesi dalla seta essiccata (mesi 2 $^1/_2$), furono ancora attive verso il coniglio, anche se innestate sotto cute.

Esponiamo qui, con qualche dettaglio, gli esperimenti fatti, avvertendo che in tutti abbiamo istituito prove di controllo, infettando animali con succo splenico di topolino, avente, presso a poco, una virulenza, analoga a quella del materiale primo che venne usato per infettare le fettuccie di seta.

1. Essiccamento di giorni 7 = animali di prova 2 topolini — controllo 1 topolino. Morte = dopo 48 ore così negli animali di prova che nel controllo.

Lesioni anatomiche (nei topolini di prova) = edema ed essudato locali, milza leggermente ingrandita. Esame batterioscopico: numerosi cocchi isolati ed a catena nell'essudato locale, scarsi nel sangue e nel succo splenico.

Lesioni anatomiche (nel controllo) = milza voluminosa, catarro diffuso dell' intestino, essudato esteso nello località d' innesto. Esame batterioscopico: cocchi nel sangue, diplococchi nella milza, catene nella località di innesto.

Colture seta — positive e con rigoglioso e rapido sviluppo.

2. Essiccamento di giorni 14 — animali di prova e di controllo — topolini.

Morte quasi contemporanea degli uni e degli altri.

Lesioni anatomiche: milza voluminosissima, con emorragie, essudato ed edema locale. Esame batterioscopico: numerosissimi cocchi isolati ed appaiati nel sangue e nella milza, corte catene nell'essudato locale.

Colture seta — positive.

3. Essiccamento di giorni 21 — animali di prova e di controllo — topolini.

I primi muoiono in 4ª giornata, i secondi in 3ª. Lesioni anatomiche e reperti batterioscopici i soliti.

Colture seta positive e di rapido sviluppo.

4. Essiccamento di giorni 28 — animali di prova e di controllo: topolini.

I primi sopravvivono, i secondi muoiono in 3ª giornata.

Colture seta positive, benchè un po' tarde a svilupparsi.

5. Essiccamento di giorni 45 — animali di prova e di controllo: conigli e topi. I topi di prova sopravvivono, quelli di controllo muoiono in

3ª giornata; i conigli di prova soccombono in 5ª giornata, quelli controllo in meno di 48 ore.

Lesioni anatomiche dei conigli; essudato locale limitato, milza nera, voluminosa. Esame batterioscopico: pochi cocchi nell'essudato e nella milza.

Colture seta positive, rigogliose, un po' tarde a svilupparsi. In queste colture il germe riacquista tutta la sua primitiva virulenza. Infatti esse, a piccole dosi, uccidono i conigli determinando essudato purulento locale, milza voluminosa, fegato, reni congesti.

6. Essiccamento di giorni 60 — animali di prova e di controllo: conigli. I conigli di prova muoiono in 6ª-7ª giornata, i controlli in 2ª.

Lesioni anatomiche dei conigli di prova, le consuete. Esame batterioscopico: scarsi cocchi nel sangue, nei visceri e nella località d'innèsto.

Colture seta positive — sviluppo lento ma rigoglioso. Il microrganismo riacquista, in esse, la virulenza così da provocare la morte dei conigli nello spazio di 48 ore.

7. Essiccamento di giorni 75. La seta coltivata dà lento ma abbastanza rigoglioso sviluppo. La coltura, così ottenuta, provoca la morte in 2 conigli in 3ª giornata. Lesioni anatomiche: milza, fegato voluminosi, limitata essudazione locale. In questa, nel sangue, nel succo splenico si riscontrano scarsi cocchi.

c) Abbiamo studiato l'azione delle alte temperature sullo *streptococcus equi*, adoperando le solite fettuccie di seta, infettate con succo di milza di topo. Venivano esse immerse in provette di uguale calibro e contenenti esattamente 10 c.c di brodo nutritivo, le quali erano poste entro un bagnomaria, già precedentemente portato alla temperatura voluta che fu, nelle varie esperienze, di 60°, 80°, 100°. Un termometro pronto e sensibile entro una provetta, contenente parimenti 10 c.c di brodo e immersa colle altre nel bagno-maria, indicava a noi il momento preciso in cui la temperatura del brodo raggiungeva quella dell'acqua. Nel corso della ricerca, le provette venivano successivamente estratte dal bagno e, raffreddate sotto uno zampillo d'acqua, erano poste in termostato a 37°. Nella tabellina seguente esponiamo i risultati avuti; col segno + viene indicato lo sviluppo positivo delle colture, col segno — il nessun sviluppo.

GRADO della temperatura	DURATA D'AZIONE DELLA TEMPERATURA						
	5′	10′	15′	20′	30′	45′	60′
60°	+	+	+	+	+	+	+
80°	+	+					
100°	—	—					

Però, se le temperature, alquanto elevate, non distruggono la vitalità dello streptococco, lo attenuano nella virulenza. Infatti i topi, inoculati con la seta, mantenuta per 1 ora a 60°, sopravvissero e così pure quelli nei quali si fece l'inoculazione con materiale, esposto per 10' a 80°.

L'attenuazione viene portata anche sui prodotti tossici del microrganismo. Questi non determinano più alcuna lesione quando siano tenuti, per un certo tempo, a 100°. Ciò abbiamo esperimentato facendo bollire per 5' delle colture in brodo virulentissime di streptococco.

d) Un'influenza spiccata abbiamo veduto avere sulla biologia e sulla virulenza dello *streptococcus equi*, l'azione della luce solare. A questa abbiamo esposto l'essudato locale di topolini, morti in 3ª giornata, disteso in sottilissimo strato su piccoli brandelli di seta, che venivano chiusi in capsule Petri sterili. Durante le ore di esperimento, la temperatura al sole oscillò fra 40° e 45°. Di ora in ora si tagliava, con forbici sterilizzate, un piccolo frammento di seta; una parte veniva coltivata in brodo, l'altra inoculata sotto cute ai topolini. Nella I e II ora poche differenze si notarono nello sviluppo dello streptococco in coltura e nella sua azione sugli animali in confronto ai controlli, nei quali venne adoperato un frammento di seta, tenuta al di fuori dell'influenza della luce. Ma a partire dalla III ora si rilevò più lento e meno rigoglioso avvenire lo sviluppo delle colture e seguire la morte degli animali con uno, due giorni di ritardo in confronto dei controlli. Ciò si rese ancor più manifesto ulteriormente, sino a che, dopo 8 ore di azione dei raggi solari, lo streptococco, avendo pur dato ancora, benchè tardo e povero, sviluppo in coltura, si rese inattivo verso i topolini.

e) I processi putrefattivi distruggono la virulenza dello *streptococcus equi*. Ciò abbiamo notato adoperando, per inoculazioni sottocutanee, milza e visceri di animali, morti acutamente e sezionati quando la putrefazione era in atto. Già all'iniziarsi di questa, si vide diminuire la virulenza dello streptococco e gradatamente scemare sino a perdersi del tutto.

IV.

Il microrganismo, da noi isolato dai prodotti morbosi del cavallo, per caratteri morfologici e biologici assomiglia a quello descritto da Schüetz, da Poels, da Nocard. Abbiamo potuto coltivarlo facilmente nei mezzi di nutrizione, ciò che non era riescito allo Schüetz, ed abbiamo constatato che esso si mostra molto attivo verso il coniglio ed anche talvolta verso la cavia, mentre invece il Nocard afferma ciò non avvenire costantemente. Devesi però considerare che lo streptococco, da noi studiato, ebbe a rinforzare, nei continui passaggi attraverso l'organismo degli animali di laboratorio, la originaria e notevole virulenza, dimostratasi nelle manifestazioni cliniche e patologiche dei cavalli

affetti. Quand'esso venne ad arte attenuato (colture mantenute parecchi giorni in termostato a 37°) vedemmo non agire che localmente e in modo transitorio ed allora, solo in notevole quantità, dare fenomeni generali d'infezione. Questo modificarsi dell'azione patogena, come è per altri batteri, oltre che all'attenuazione, è legato anche per lo *streptococcus equi* alla porta di sua penetrazione nell'organismo animale. E noi vedemmo ad es., l'inoculazione, sotto cute dell'orecchio, di colture attenuate determinare nel coniglio delle alterazioni eresipelatoidi ed, altre volte, nello stesso animale e nelle cavie degli ascessi più o meno estesi; l'innesto nel peritoneo provocare essudazione fibrinosa e successsiva setticemia, nel torrente circolatorio lesioni viscerali multiple, a carattere congestizio ed emorragico. Queste varie alterazioni non segnano una linea netta di demarcazione fra il modo di agire nell'organismo animale dello *streptococcus equi* e dello streptococco piogeno. Anche questo, come ha dimostrato Marmorek [1] e come noi stessi abbiamo potuto convincerci con proprie esperienze, può essere condotto a gradi di virulenza tali da determinare successivamente, avuto riguardo anche alla porta d'entrata, l'ascesso, l'eresipela, l'essudazione fibrinosa, l'infezione violenta e la setticemia a decorso rapido. Se ora notiamo sotto quali vari modi si manifesti la *gourme* nei cavalli e ne studiamo i diversi aspetti clinici, rileviamo che in questa malattia si possono riscontrare suppurazioni locali o diffuse, infiammazioni eresipelatose della pelle e del tessuto sottocutaneo delle regioni della testa, essudati purulenti nel peritoneo, nelle articolazioni, periostiti e carie delle ossa ecc., ed oltre a ciò pneumoniti lobulari e lobari, pleuriti, pericarditi peritoniti, artriti, meningiti ecc. E non diverse e multiple lesioni può determinare lo streptococco piogene nell'uomo; dall'ascesso alla forma acutissima setticemica è una lunga serie di lesioni organiche, nello svolgersi delle quali può essere seguita la graduale virulenza del microrganismo.

Se poi, staccandoci dai quadri clinici e dalle alterazioni patologiche, studiamo lo *streptococcus equi* nella sua entità batteriologica, vediamo come esso non possa venire assolutamente differenziato dallo streptococco piogene. La forma, il modo di disporsi in catene, il modo di sviluppo nei mezzi artificiali costituiscono caratteri comuni ai due microrganismi, variabili in amendue secondo la composizione del mezzo di coltura, secondo il grado di virulenza.

Quelle modificazioni che il Marmorek ha osservato studiando parecchie varietà di streptococchi e per la costanza delle quali egli ha

[1] *Annales de l'institut Pasteur*, 1895.

creduto di riconoscere un solo tipo, valgono anche per lo *streptococcus equi*. Influiscono su di esse molti fattori, la natura e le condizioni del mezzo in cui il microbio cresce, ciò che già Widal e Besançon [1] hanno dimostrato.

I caratteri che v. Lingelsheim, [2] Behring, [3] Marot [4] hanno fissato come tipici per distinguere i diversi streptococchi (brevi o lunghe catene, differenze di coltura nel brodo, differenze d'aspetto delle colture su patata) non possono essere presi come base di differenzazione dello *streptococcus equi* dagli altri, ad esso affini. Anche il modo di comportarsi di questo microrganismo di fronte al siero di Marmorek ci induce a credere che esso non rappresenti un'individualità a sè. Per quanto pochi siano gli esperimenti che noi abbiamo istituito sotto questo punto di vista, pure essi ci hanno dimostrato che il siero conferisce un certo grado di resistenza agli animali inoculati.

Come lo streptococco piogene, lo *streptococcus equi* si è dimostrato resistente all'influenza degli agenti chimico-fisici.

Dall'insieme delle nostre osservazioni siamo pertanto venuti nella convinzione che il microrganismo, che è la causa della *gourme* dei cavalli, non sia che lo streptococco piogene. Nella storia stessa di questa malattia vi è un dato clinico e patologico che appoggia il nostro asserto.

Nei trattati di medicina veterinaria viene descritta una forma di *gourme traumatica*, la quale segue non di rado all'atto operativo della castrazione. Per i pochi riguardi antisettici, osservati durante l'operazione, e per venir applicato, come ancora si fa da qualche empirico, sulla ferita terra od altro, si stabilisce un processo suppurativo nella regione del cordone spermatico, il quale va quindi estendendosi.

Quale differenza possiamo noi trovare in ciò con quelle gravi suppurazioni, sì frequenti un tempo nella pratica chirurgica umana e che accompagnavano gli atti operativi?

Diffuso come è lo streptococco piogene nel mondo esterno, facilmente può trovare nelle stalle le condizioni per assumere gradi vari di virulenza e per determinare negli equini quelle svariate lesioni, che costituiscono il multiforme aspetto clinico ed anatomo patologico della *gourme*.

---

[1] *Archives de médicine expérimentale*, 1896.
[2] *Zeitschrift für Hygiene*, vol. X, 1892.
[3] *Centralblatt für Bakteriologie*, vol. XII, 1892.
[4] *Archives de médicine expérimentale*, 1893.

Clinica Pediatrica della R. Università di Roma

SULLA TOSSICITÀ DEL BACILLO DI LOEFFLER

IN RAPPORTO ALLA SUA MORFOLOGIA

PER

LUIGI Prof. CONCETTI
Direttore della Clinica.

GIOVANNI Dott. MEMMO
Assistente.

In una pubblicazione comparsa negli Annali dell'Istituto Pasteur nell'anno 1892, [1] il Martin distingueva tre varietà di bacilli difterici: una rappresentata da bacilli corti, più o meno uniformemente colorati, disposti per lo più parallelamente: una da bacilli grossi, lunghi, spesso terminati a clava con 2-3 punti intermedii scolorati, intrecciati variamente fra loro: ed una terza varietà di bacilli di media grandezza, quasi forma di passaggio dalla prima alla seconda. A queste tre varietà attribuiva inoltre un grado diverso di potere patogeno, nel senso che i bacilli corti fossero poco tossici, quelli mezzani lo fossero di più, mentre la massima virulenza apparterrebbe ai bacilli grossi, clavati. Queste affermazioni sono state accettate dalla maggior parte dei clinici di Francia, e non compare relazione di un esame batteriologico, senza che non vi si trovi specificata le morfologia del bacillo, e su questa non si regoli la prognosi, e quello che ci sembra grave, anche la indicazione terapeutica.

È così che, per non permetterci che due citazioni, Barbier diceva che: Seule l'existence du bacille long, enchévêtré aurait eu une valeur réelle, au point de vue morphologique, du moins. E Chantemesse : Quand on nous parle du bacille diphtérique, il faut nous dire si ce bacille est long, s'il a la forme enchévêtrée, et c'est alors seulement qu'on pourra admettre qu'il y a eu diphtérie. [2] E per quello che riguarda il criterio terapeutico vediamo che alcuni, presi da non sappiamo quali esagerati

---

[1] *Examen clinique et bactériologique de 200 enfants entrés au pavillon de la diphterie.*

[2] V. Grancher I. *Le diagnostic bactériologique et le diagnostic clinique de la diphtérie.* — Journal de clinique et thérap. infantile, 18 mars 1893, pag. 201 et suiv.

timori di possibili e fantastiche azioni nocive attribuite al siero antidifterico, sono giunti a stabilire come assioma che quando in un difterico l'esame batteriologico, limitato alla semplice osservazione microscopica, rivela la sola varietà di piccoli bacilli, si può e forse si deve fare a meno d'intervenire colla sieroterapia, la quale deve essere riservata solo a quei casi che presentano la varietà media e grossa del bacillo, segno di virulenza maggiore e perciò di maggiore gravezza. Ora abbiamo detto che tale deduzione ci sembra grave per le funeste conseguenze a cui può dar luogo, posto che tale ottimismo destato dalla presenza dei bacilli corti abbia poco fondamento.

Uno di noi già in altre pubblicazioni [1] in base ad osservazioni personali aveva sostenuto la non esattezza delle affermazioni di Martin, e credeva piuttosto che la forma lunga e grossa dei bacilli dipendesse o da una specialità del terreno di coltura, o rappresentasse forme vecchie vicine al periodo involutivo e di segmentazione. Infatti esse si trovano più spesso nelle colture vecchie e raramente in quelle recenti ove predominano i bacilli corti, trovati del resto anche questi il più delle volte virulentissimi.

Se qualche volta le colture vecchie contenenti in predominio i bacilli lunghi si sono mostrate più tossiche, affermavamo ciò potesse dipendere dal fatto che il brodo contenesse maggiore quantità di sostanza tossica proveniente non solo dalla vita dei bacilli, ma ancora dalla loro macerazione, perchè si sa che il protoplasma dei bacilli stessi anche morti è dotato di un alto potere tossico.

In seguito non sono mancate qua e là delle osservazioni tendenti ad infirmare le asserzioni di Martin. Così Sabatier trovò che se è vero che la presenza del bacillo corto è ordinariamente di un pronostico più favorevole, ciò non è la regola assoluta: si vedono casi gravi ed anche mortali in cui non esiste che il bacillo corto; e d'altra parte il bacillo lungo è stato riscontrato in casi di una rimarchevole benignità [2]. P. Simon cita due casi in cui l'esame batteriologico rilevò il bacillo lungo. Ora uno di questi casi coincideva con una forma di angina pultacea delle più benigne, mentre l'altro era dato da una angina difterica grave. Il bacillo lungo, clavato, ricavato dal primo caso, inoculato in una cavia alla dose di 1 c.c. di coltura pura di due giorni non dette luogo nep-

---

[1] Concetti. *Studi clinici e sperimentali sulla difterite.* — Roma, tip. Giov. Bertero, 1894, pag. 24-25.

— *La difterite.* Tratt. Ital. di Patol. e terap. med. diretto dal prof. Maragliano. Vol. I, parte V, pag. 10-11.

[2] Thèse de Paris, 1896. Cit. da Simon; vedi appresso

pure ad un leggero edema locale. [1] Gougueneim [2] studiando la difterite negli adulti asserisce che il bacillo di Loeffler può essere lungo, medio e corto senza che questo aspetto abbia un significato dal punto di vista della natura benigna o grave dell'affezione.

Raccogliendo quelle nostre osservazioni ove è messa in rapporto la gravezza della forma clinica col reperto batteriologico, dal punto di vista della morfologia del bacillo, vediamo come la forma grave o mite della malattia non possa essere affatto giudicata in base alla grandezza od alla forma del bacillo medesimo. E quando parliamo di gravezza intendiamo di limitarci a quei casi seguiti da morte, essendo che gli altri criterî potrebbero essere troppo subbiettivi, e suscitare il dubbio che uno possa essere stato suggestionato dalla tesi che ha preso a sostenere. Sono in tutto 39 casi, di cui 25 seguiti da guarigione e 14 da morte, ossia in cui la mortalità è rappresentata da una percentuale di 35,89. Ora in questi 39 casi il reperto batteriologico microscopico, e la mortalità sono esposti nel seguente specchietto:

Forme bacillari	Totale	Guariti	Morti	Mortalità °/₀
Forme piccole	14	9	5	35. 71
Id. medie	5	3	2	20. 00
Id. grosse	6	4	2	33. 33
Id. miste piccole e medie .	3	2	1	33. 33
Id. id. piccole e grandi .	3	3	0	00. 00
Id. id. medie e grandi .	7	3	4	57. 14
Totale . . .	39	25	14	35. 89
Casi con presenza di forme grosse	16	10	6	37. 50

Come si vede, le forme esclusivamente piccole ci han dato una mortalità perfino superiore alle forme esclusivamente grandi, e di più che

[1] P. Simon. *Du diagnostic des angines diphtériques.* Journ. de Clin. et thérap. infant., 25 fevr. 1897, pag. 145.

[2] Gougueneim. *Sur la diphtérie de l'adulte.* Soc. méd. des Hôpitaux, 29 janvier 1897. — Semaine médicale, 3 février 1897.

un terzo superiore alle forme esclusivamente medie: solo l'unione delle forme grandi alle medie avrebbe dato una mortalità superiore; mentre riunendo tutti i casi in cui si constatarono forme grandi, sia sole, sia unite alle piccole ed alle medie, la mortalità è stata presso a poco uguale a quella delle forme piccole ed a quella del totale delle osservazioni.

Nella casuistica dei 21 casi che sotto riportiamo e che hanno somministrato il materiale per i nostri esperimenti (v. tabella a pag. 18, 19 e 20), troviamo indicata 15 volte la forma clinica grave, seguita da guarigione in 7 casi e da morte negli altri 8. Ora in questi 15 casi risultava la forma bacillare piccola in 7, la media in 1, la grossa in 2, la forma mista piccola e media in 1, la forma mista media e grande in 4. Mentre in 4 casi in cui si ha la indicazione di forma clinica leggera, in 2 si ebbero forme bacillari piccole, ed in 2 grosse.

Però queste osservazioni cliniche così studiate non ci danno affatto un criterio sicuro per risolvere la questione se quella data forma bacillare abbia un grado di tossicità magggiore o minore di un'altra. La gravezza di ogni singolo caso di affezione difterica ed anche la sua letalità stanno in rapporto con un complesso di cause fra cui la virulenza e la tossicità del bacillo patogeno occupano forse il posto meno importante. Si sa infatti che il massimo peso deve darsi alla maggiore o minore resistenza locale e generale dell'organismo che lo alberga a risentirne i tristi effetti. Vi sono individui dotati di una massima resistenza locale e generale, che sono assolutamente immuni, ed in essi può trovarsi un bacillo dotato per gli animali, e per gli altri organismi umani del massimo potere patogeno, senza che nel caso speciale dia luogo alla minima manifestazione morbosa. Per l'opposto ve ne sono altri in cui i poteri di resistenza sono minimi, ed allora un bacillo dotato di un grado molto minore di virulenza e di tossicità può in essi produrre effetti gravissimi ed anche letali. Fra questi due estremi vi sono una quantità di modalità di resistenza sia locale delle mucose, sia generale, da dare la spiegazione delle varie manifestazioni morbose presentate dai vari individui esposti alla stessa causa di contagio. Di più vi sono le associazioni batteriche per cui alcuni altri microrganismi più o meno patogeni (streptococchi, stafilococchi, pneumococco, Friädlander, bacterium coli comune, ecc.), possono mescolarsi al bacillo difterico, e preso il sopravvento, determinare essi stessi la gravezza speciale e la morte, aiutati in ciò anche dallo stesso intossicamento difterico che, benchè sia leggero, pure diminuisce la resistenza dell'organismo di fronte ai detti batterii di associazione.

È per ciò che noi dopo aver riferito questi dati clinici, dando loro

soltanto il valore che possono avere, e giusto per contrapporli a quelli dei nostri colleghi di Francia, i quali senza curarsi di altre ricerche, han voluto dar loro un valore assoluto, abbiamo voluto studiare la quesione da un punto di vista piu esatto e diremo ancora più scientifico. Abbiamo cioè voluto vedere e misurare il grado di tossicità delle varie forme bacillari, estraendone la tossina e determinando il potere tossico della medesima sulle cavie che, come si sa, sono sensibilissime a tale genere di avvelenamento.

Il materiale è stato raccolto sempre dalla gola di bambini difterici. In qualche caso, fra quelli morti all' Ospedale, si è fatta una seconda raccolta all'autossia. Tenevamo sempre pronti a nostra disposizione dei tubi di vetro contenenti un asse di vetro o di legno portante alla sua estremità un tamponcino di ovatta bene fissato, ed il tutto naturalmente bene sterilizzato dapprima in stufa a secco. Nel momento che volevamo raccogliere il materiale, estraevamo l'asta dal tubo, e portavamo sulla parte malata il tamponcino di ovatta asportando muchi e brani di false membrane, e la bacchettina veniva di poi immediatamente riposta nello stesso tubo sterilizzato che si portava senza perdita di tempo al laboratorio. Ivi si faceva subito un primo esame microscopico in preparati a secco, colorati con lo Zihel e col bleu di metilene per vedere la forma e la disposizione dei bacilli. Poi si stemperava l'ovatta in un altro tubo contenente brodo sterile, e da questo si facevano le colture a piatto in agar-agar glicerinato nelle capsule di Petri. Dopo 48 ore di sfusa a 37° si facevano molti preparati in goccia pendente ed altri a secco colorati, per stabilire con più precisione e con più sicurezza la forma bacillare e studiarne i caratteri morfologici, specialmente se le prime ricerche fossero state poco decisive. I risultati di queste due osservazioni erano sempre identici per ciò che concerne la forma, la grandezza e la disposizione dei bacilli.

Contemporaneamente colle colonie isolate dalle colture a piatto, si seminavano dei fiaschi contenenti ciascuno 500 c.c. di brodo sterile, neutro, preparato con carne di cavallo ucciso da 3 giorni. Questi fiaschi venivano posti nel termostato, al buio, ad una temperatura costante di 35°, e vi si lasciavano per 30 giorni. Al 30° giorno si esaminavano al microscopio in goccia pendente, ed in preparati colorati e si notavano le apparenze e le differenze rispetto alla morfologia.

Con delle colture a piatto in agar-agar ci rendevamo certi che la coltura non fosse stata inquinata, e facendo uso sempre di una stessa ansa di platino, si poteva, fino ad un certo punto, valutare approssimativamente il numero dei microrganismi. Assicurati di ciò, il liquido veniva filtrato attraverso lo Chamberland e conservato in tubi sterilizzati

fuori dell'azione della luce. Abbiamo avuto l'avvertenza di escludere per gli esperimenti i primi filtrati, e di cominciare solo ad utilizzare il liquido dal 5° tubo in poi, perchè secondo le ricerche di Dziergowski, i primi prodotti di filtrazione contengono un potere tossico meno elevato [1]. Gli animali scelti per l'esperimento, sono stati, come dicemmo, le cavie: la via di inoculazione, la sottocutanea; e come indicazione di potere tossico abbiamo ritenuto come dose minima mortale quella dose di tossina che entro i primi quattro giorni vale ad uccidere un grammo di peso dell'animale.

Questa dose, secondo i dettati di Behring, sarebbe espressa dalla formula + 1 M. Lasciamo la lettera M. che è l'abbreviazione di *Meerschweinchen* (cavia) per mantenere alla formula il carattere tipico originale che dovrebbe essere accettato universalmente nel linguaggio internazionale. Italianizzando la formula si dovrebbe scrivere + 1 C.

Il peso della cavia in grammi si esprime mettendo la cifra dei grammi come esponente (M^{250}). Secondo Behring l'unità di dose tossica minima mortale è data da quella tossina che alla dose di cc. 0,01 uccide in 4 giorni una cavia del peso di grammi 250, e questa combinazione è rappresentata dalla formula:

$$\text{cc. } 0{,}01\ DTN = + M.^{250}$$

la quale può essere espressa anche così:

$$1 \text{ ccm. } \frac{DTN}{100} = + 250 \text{ M.}$$

Questa tossina alla dose di un centimetro cubo ucciderebbe per conseguenza 100 cavie del peso di 250 grammi ciascuna:

$$1 \text{ ccm. } DTN = + 25000 \text{ M.}$$ [2]

Il numero dei casi in cui abbiamo fatto le nostre ricerche è stato di 21, offertici da bambini i quali presentavano localizzazioni o faringee a laringee od ambedue contemporaneamente. In qualche caso la presa del materiale è stata fatta due volte, e qualche volta anche sul cadavere.

Ecco il dettaglio delle nostre esperienze:

CASO I. (13 gennaio 1896). Gra. A., di anni 4. Forma clinica discretamente grave. Localizzazione estesa a tutte le fauci ed alle narici. Presa del materiale in seconda giornata, prima dell' intervento sieroterapico. Iniezione di 3000 U. I. Guarigione.

L'esame batteriologico dette bacillo di Loeffler con streptococco piogeno. Riguardo alla forma bacillare, predominavano i piccoli, ve ne erano molti di grandezza media, bene colorati, senza lacune e scarsissime forme clavate.

---

[1] S. DZIERGOWSKI. *Sur la filtration des substances albuminoïdes à propriétés actives*. Archives des scienc. biolog. St. Pétersbourg, 1895. Th IV, n. 3.
[2] BEHRING. *Fortschritte der Medic.* 1. Ian. 1897.

Dopo un mese di coltura in brodo si vedevano esclusivamente le forme grandi con numerose lacune non colorate, ed abbondanti le forme clavate. Il liquido filtrato fu inoculato alle cavie con i seguenti risultati:

Data d'inoculazione	Animale inoculato	Peso	Dose inoculata	Risultato
14 febb. 1896	Cavia 1ª	259 gram.	0. 04 °/₀	Sopravvissuta
Id.	Id. 2ª	354 id.	0. 11 °/₀	Id.
19 febb. 1896	Id. 3ª	453 id.	0. 16 °/₀	Id.
Id.	Id. 4ª	520 id.	0. 20 °/₀	Id.
25 febb. 1896	Id. 5ª	370 id.	0. 3 °/₀	Morta dopo 8 giorni
Id.	Id. 6ª	385 id.	0. 4 °/₀	Morta dopo 7 giorni
1 marzo 1896	Id. 7ª	510 id.	0. 5 °/₀	Morta dopo 5 giorni
Id.	Id. 8ª	240 id.	0. 5 °/₀	Morta dopo 4 giorni

La dose minima mortale fu per conseguenza di 0,005 per ogni grammo di peso di animale.

Caso II. (23 gennaio 1896). Fall.... Ida, di anni 6. Localizzazione laringea nel periodo asfittico (VI giornata). Il materiale fu preso da una grossa e lunga falsa membrana emessa colla intubazione. Fino allora non era stata praticata alcuna iniezione di siero. La sieroterapia fu iniziata nello stesso momento della intubazione ed in tutto furono iniettate 4000 U. I. Guarigione.

L'esame batteriologico dette bacillo di Loeffler, scarse colonie di stafilococco piogene aureo, ed abbondanti di streptococco piogene. Le forme bacillari erano tutte piccolissime, alcune non uniformemente colorate. Dopo un mese di coltura in stufa erano scomparse le forme piccolissime, e predominavano le forme medie alcune con vacuoli, altre a clava. Il liquido di coltura filtrato dette i seguenti risultati:

Data d'inoculazione	Animale inoculato	Peso	Dose inoculata	Risultato
25 febb. 1896	Cavia 1ª	210 gram.	0. 12 °/₀	Sopravvissuta
Id.	Id. 2ª	215 id.	0. 23 °/₀	Id.
1 marzo 1896	Id. 3ª	535 id.	0. 35 °/₀	Id.
Id.	Id. 4ª	412 id.	0. 4 °/₀	Id.
Id.	Id. 5ª	325 id.	0. 5 °/₀	Morta dopo 4 giorni
Id.	Id. 6ª	225 id.	0. 5 °/₀	Morta dopo 3 giorni

Dose minima mortale 0. 005.

Caso III. (18 gennaio 1896). Dubini Giuseppe di anni 8 (Ospedale). Localizzazione a tutte le fauci. Presa del materiale in IV giornata, ed inizio della cura col siero (3000 U. I.). Forma molto grave. Guarigione. L'esame batteriologico dette bacillo di Loeffler e predominanti moltissime colonie di streptococco piogene. Il bacillo di Loeffler aveva forme di media grandezza, tozze, bene colorite e con rare forme grandi e clavate. Dopo un mese di stufa apparivano solo le forme grandi a grosse clave. Il liquido di coltura filtrato si comportò colle cavie nel modo seguente:

Data d'inoculazione	Animale inoculato	Peso	Dose inoculata	Risultato
7 marzo 1896	Cavia 1ª	380 gram.	0. 05 °/₀	Sopravvissuta
Id.	Id. 2ª	420 id.	0. 1 °/₀	Morta dopo 8 giorni
10 marz. 1896	Id. 3ª	315 id.	0. 14 °/₀	Morta dopo 7 giorni
Id.	Id. 4ª	235 id.	0. 2 °/₀	Morta dopo 4 giorni
13 marz. 1896	Id. 5ª	325 id.	0. 3 °/₀	Morta dopo 50 ore
Id.	Id. 6ª	280 id.	0. 5 °/₀	Morta dopo 48 ore

Dose di tossina minima mortale 0. 005.

Caso IV. (17 gennaio 1896). Dubini Giovanni di un anno, fratello del precedente (Ospedale). Localizzazione a tutte le fauci, bocca e narici. Adenopatie notevolissime con edema perighiandolare. Presa del materiale e sieroterapia in III giornata Unità immunizzanti iniettate 4000. Forma estremamente grave. Morte. L'esame batteriologico dette bacillo di Loeffler unito a moltissime colonie di streptococco piogene. Il bacillo di Loeffler si mostrò con molte forme piccole e quasi nella stessa proporzione con forme di media grandezza bene colorate. Dopo un mese di stufa si vedevano solo le forme grosse clavate.

Il liquido filtrato dette i seguenti risultati nelle cavie:

Data d'inoculazione	Animale inoculato	Peso	Dose inoculata	Risultato
7 marzo 1896	Cavia 1ª	350 gram.	0. 5 °/₀	Morta dopo 18 ore
Id.	Id. 2ª	280 id.	0. 3 °/₀	Morta dodo 20 ore
9 marzo 1896	Id. 3ª	380 id.	0. 1 °/₀	Morta dopo 30 ore
Id.	Id. 4ª	280 id.	0. 02 °/₀	Morta dopo 6 giorni
12 marz. 1896	Id. 5ª	285 id.	0. 03 °/₀	Morta dopo 5 giorni
Id.	Id. 6ª	220 id.	0. 04 °/₀	Morta dopo 4 giorni
Id.	Id. 7ª	230 id.	0. 06 °/₀	Morta dopo 2 giorni
Id.	Id. 8ª	325 id.	0. 04 °/₀	Morta dopo 4 giorni

Dose minima mortale 0. 0004.

Caso V. (26 gennaio 1896) Ces.... E., di anni 7. Localizzazione alle fauci ed alle narici. Adenopatia notevole con edema perighiandolare. Presa del materiale ed inizio della sieroterapia in III giornata; U. I. inoculate 4000. Forma clinica gravissima. Morte. All'esame batteriologico si ebbe bacillo di Loeffler, e varie colonie di stafilococco piogene aureo ed abbondanti di streptococco piogene. Il bacillo della difterite presentavasi solo sotto l'aspetto di forme grosse, molte terminate a clava. Dopo un mese di stufa erano forme grandissime, parecchie a clava.

Il liquido filtrato dette nelle cavie i seguenti risultati:

Data d'inoculazione	Animale inoculato	Peso	Dose inoculata	Risultato
17 marz. 1896	Cavia 1ª	210 gram.	0.01 °/₀	Morta dopo 7 giorni
Id.	Id. 2ª	390 id.	0.02 °/₀	Sopravvissuta
30 marz. 1896	Id. 3ª	210 id.	0.05 °/₀	Id.
Id.	Id. 4ª	300 id.	0.1 °/₀	Id.
Id.	Id. 5ª	340 id.	0.2 °/₀	Id.
18 aprile 1896	Id. 6ª	470 id.	0.3 °/₀	Morta dopo 7 giorni
Id.	Id. 7ª	320 id.	0.4 °/₀	Morta dopo 5 giorni
Id.	Id. 8ª	260 id.	0.5 °/₀	Morta dopo 4 giorni

Dose minima mortale 0.005.

Caso VI. (10 marzo 1896). Faucero Ludovico, di 2 anni e mezzo (Ospedale). Localizzazione alle fauci, laringe e bronchi. Sieroterapia e raccolta del materiale in III giornata di malattia; U. I. inoculate 2000. Morte dopo 15 ore dalla iniezione.

L'esame batteriologico dette bacillo della difterite, e varie colonie di stafilococco piogene aureo ed albo, ed abbondanti di streptococco piogene. Il bacillo di Loeffler presentava esclusivamente forme di media grandezza benissimo colorate. Dopo un mese di stufa si vedevano le stesse forme di media grandezza per la massima parte però non colorate uniformemente, insieme a molte forme grandi ed a clava.

Il potere tossico del liquido filtrato fu il seguente:

Data d'inoculazione	Animale inoculato	Peso	Tossina inoculata	Risultato
30 marz. 1896	Cavia 1ª	215 gram.	0.05 °/₀	Sopravvissuta
Id.	Id. 2ª	322 id.	0.1 °/₀	Id.
3 aprile 1896	Id. 3ª	340 id.	0 2 °/₀	Id.
Id.	Id. 4ª	450 id.	0.3 °/₀	Id.
10 aprile 1896	Id. 5ª	275 id.	0.5 °/₀	Morta dopo 8 giorni
Id.	Id. 6ª	270 id.	0.7 °/₀	Morta dopo 4 giorni
Id.	Id. 7ª	350 id.	1. °/₀	Morta dopo 2 giorni

Dose minima mortale 0.007.

Caso VII. (22 giugno 96). Ricci Vincenzo, di anni 3. (Ospedale). Localizzazione alle fauci ed alla laringe. Forma difterica gravissima insorta nel corso di un morbillo. Bronco-pulmonite. Sieroterapia in II giornata (U. I. 3000) e contemporaneamente raccolta del materiale. Morte. L'esame batteriologico dette bacillo di Loeffler associato ad abbondantissime colonie di streptococco piogene. Erano forme bacillari esclusivamente piccole non benissimo ed uniformemente colorate. Dopo un mese di stufa si vedevano solo forme grandissime ed a clava.

Il liquido filtrato dette i seguenti risultati:

Data d'inoculazione	Animale inoculato	Peso	Tossina inoculata	Risultato
3 aprile 1896	Cavia 1ª	267 gram.	0.1 °/₀	Sopravvissuta
Id.	Id. 2ª	180 id.	0.2 °/₀	Id.
6 aprile 1869	Id. 3ª	210 id.	0.3 °/₀	Morta dopo 6 giorni
Id.	Id. 4ª	300 id.	0.4 °/₀	Morta dopo 7 giorni
Id.	Id. 5ª	240 id.	0.5 °/₀	Morta dopo 5 giorni
Id.	Id. 6ª	270 id.	0.6 °/₀	Morta dopo 3 giorni

Dose minima mortale 0,006.

Caso VIII. (25 febbraio 96). Serafino Giuseppe, di anni 8. (Ospedale). Localizzazione laringea. Forma mite ad andamento lentissimo. Sieroterapia dopo un mese. Raccolta del materiale di ricerca dopo due mesi, e dopo di avere avuto già iniettate 5000 U. I. Tracheotomia dopo 3 mesi. Guarigione L'esame batteriologico dette bacillo di Loeffler, streptococco piogene, e pneumo-bacillo di Fiedländer. Il bacillo di Loeffler era dato da forme di media grandezza con molte grandi ed a clava. Dopo un mese di stufa in brodo esistevano solo le forme grandi, non bene colorate, a clava.

Il liquido filtrato dette questi risultati:

Data d'inoculazione	Animale inoculato	Peso	Tossina inoculata	Risultato
4 aprile 1896	Cavia 1ª	370 gram.	0.5 °/₀	Sopravvissuta
Id.	Id. 2ª	170 id.	1. °/₀	Id.
22 aprile 1896	Id. 3ª	230 id.	2. °/₀	Morta dopo 10 giorni
Id.	Id. 4ª	200 id.	3. °/₀	Morta dopo 8 giorni

Dose minima mortale 0.03.

Caso IX. (20 giugno 96). Margutti Gregorio, di anni 2. (Ospedale). Localizzazione laringea nel corso del morbillo in soggetto atrofico. Bronco-polmonite. Morte rapidissima prima dell'intervento della sieroterapia. L'esame batteriologico su materiale preso dal cadavere dette colonie di bacillo di Loeffler, ed in predominio di streptococco piogene. Forme bacillari piccole, tozze, bene colorite. Dopo un mese di stufa si vedevano forme esclusivamente grandi, ed a clava.

La tossicità del liquido filtrato fu la seguente:

Data d' inoculazione	Animale inoculato	Peso	Dose inoculata	Risultato
12 aprile 1896	Cavia 1ª	200 gram.	0. 2 °/₀	Sopravvissuta
Id.	Id. 2ª	220 id.	0 4 °/₀	Id.
14 aprile 1896	Id. 3ª	250 id.	0. 5 °/₀	Id.
Id.	Id. 4ª	270 id.	0. 7 °/₀	Morta dopo 4 giorni
Id.	Id. 5ª	225 id	1. °/₀	Morta in 48 ore

Dose minima mortale 0. 007.

Caso X. (21 giugno 96). Castellani Giuseppe, di anni 1 1|2. (Ospedale). Forma clinica perfettamente simile alla precedente e rapidamente mortale. L'esame batteriologico dette bacillo di Loeffler, abbondante streptococco piogene, e scarsi lo stafilococco piogene aureo ed il pneumo-bacillo di Friedländer. Il bacillo di Loeffler presentava forme di media grandezza associate a molte grandi. Dopo un mese di stufa le forme grandi erano le sole che si scorgevano con grosse clave.

La tossicità del liquido filtrato fu la seguente:

Data d' inoculazione	Animale inoculato	Peso	Dose inoculata	Risultato
12 aprile 1896	Cavia 1ª	350 gram.	0. 1 °/₀	Sopravvissuta
Id.	Id. 2ª	230 id.	0. 2 °/₀	Id.
18 aprile 1896	Id. 3ª	230 id.	0. 25 °/₀	Morta dopo 4 giorni
Id.	Id. 4ª	170 id.	0. 3 °/₀	Morta dopo 3 giorni
Id.	Id. 5ª	230 id.	0. 5 °/₀	Morta dopo 2 giorni

Dose minima mortale 0. 003.

Caso XI. (8 marzo 96). Ceccarelli Annunziata, di anni 3. (Ospedale). Localizzazione alle fauci, laringe, bronchi. Forma gravissima. Presa del materiale ed inizio della sieroterapia al II giorno di malattia, U. I. iniettate 6000. Morte. L'esame batteriologico dette bacillo di Loeffler, stafilococco piogene

aureo, ed abbondante streptococco piogene. Forme di media grandezza miste a forme grosse, non bene colorate, spezzettate. Dopo un mese di stufa si vedevano esclusivamente forme grandi clavate. Ripetuta la ricerca dopo morte si ebbe lo stesso reperto batteriologico, più il pneumo-bacillo di Friedländer. La forma bacillare era uguale a quella indicata nell'esame precedente.

La tossicità del liquido filtrato fu esaminata tanto colle colture ricavate dal bacillo durante la vita, quanto da quello ricavato post mortem:

Bacillo isolato in 2ª giornata di malattia.

Data d'inoculazione	Animale inoculato	Peso	Tossina inoculata	Risultato
4 magg 1896	Cavia 1ª	300 gram.	0.2 °/₀	Sopravvissuta
Id.	Id. 2ª	240 id.	0.5 °/₀	Morta dopo 9 giorni
7 magg. 1896	Id. 3ª	290 id.	0.7 °/₀	Morta dopo 4 giorni
Id.	Id. 4ª	250 id.	0.9 °/₀	Morta dopo 48 ore
		Bacillo isolato post mortem.		
12 magg. 1896	Cavia 5ª	280 gram.	0.7 °/₀	Sopravvissuta
Id.	Id. 6ª	320 id.	0.8 °/₀	Morta dopo 9 giorni
Id.	Id. 7ª	230 id.	1. °/₀	Morta dopo 4 giorni

Dose minima mortale 0 007. — Dose id., post mortem 0.01.

Caso XII. (14 marzo 96). Maranno Antonio, di anni 4. (Ospedale). Localizzazione laringea. Raccolta del materiale e sieroterapia in I. giornata. U. I. iniettate 3000. Guarigione. L'esame batteriologico dette bacillo della difterite, streptococco piogene ed abbondante pneumo-bacillo di Friedländer. Forme bacillari grandi non bene colorate, molte a clava. Dopo un mese di stufa le forme bacillari erano ancora più grandi, non bene colorate, moltissime a grosse clave.

Il liquido filtrato mostrò la tossicità qui sotto indicata:

Data d'inoculazione	Animale inoculato	Peso	Tossina inoculata	Risultato
16 aprile 1896	Cavia 1ª	300 gram.	0.05 °/₀	Sopravvissuta
Id.	Id. 2ª	320 id.	0.1 °/₀	Morta dopo 5 giorni
19 aprile 1896	Id. 3ª	320 id.	0.2 °/₀	Morta dopo 4 giorni
Id.	Id. 4ª	250 id.	0.5 °/₀	Morta dopo 48 ore

Dose minima mortale 0.002.

Caso XIII. (14 marzo 96). Rossi Giuseppe, di anni 4. (Ospedale). Localizzazione alle fauci e laringe. Sieroterapia e raccolta del materiale in V giornata. U. I. iniettate 5000. Forma clinica gravissima. Miglioramento dopo 48 ore dal principio della cura. Guarigione. L'esame batteriologico dette bacillo di Loeffler, abbondante il pneumo-bacillo di Fiedländer, e scarso lo streptococco piogene. Forme bacillari grandi, molte a clava, non bene colorate. Dopo un mese di stufa comparivano ancora più grandi, e meno uniformemente colorate.

L'esame della tossicità del liquido filtrato dette il seguente risultato:

Data d'inoculazione	Animale inoculato	Peso	Tossina inoculata	Risultato
12 magg. 1897	Cavia 1ª	340 geam.	0. 1 %	Morta dopo 7 giorni
Id.	Id. 2ª	320 id.	0. 2 %	Morta dopo 4 giorni
Id.	Id. 3ª	250 id.	0. 5 %	Morta dopo 48 ore

Dose minima mortale 0. 002.

Caso XIV. (27 marzo 96). De Benedetti Giulio di anni 4. (Ospedale). Localizzazione alle fauci, narici e laringe. Notevoli adenopatie. Tubercolosi con escavazione dell'apice polmonare destro. Sieroterapia e raccolta del materiale in II. giornata. U. I. iniettate 3000. Forma clinica gravissima. Morte in III. giornata di malattia. L'esame batteriologico dette bacillo della difterite, abbondante lo streptococco piogene, pneumo-bacillo di Friedländer, bacillo di Koch. Forme bacillari piccole, bene colorate, senza vacuoli. Dopo un mese di stufa in brodo si vedevano solo forme-grandissime. non bene colorate.

La tossicità del liquido filtrato fu la seguente:

Data d'inoculazione	Animale inoculato	Peso	Tossina inoculata	Risultato
16 magg. 1896	Cavia 1ª	270 gram.	0. 2 %	Sopravvissuta
Id.	Id. 2ª	240 id.	0. 5 %	Id.
25 magg. 1896	Id. 3ª	230 id.	0. 7 %	Morta dopo 9 giorni
Id.	Id. 4ª	270 id.	1. %	Morta dopo 4 giorni

Dose minima mortale 0. 01.

Caso XV. (28 marzo 96). Pandori Alfonso, di anni 8. Localizzazione laringea. Tubercolosi con infiltrazione di ambedue gli apici polmonari. Sieroterapia in I giornata, e raccolta del materiale. Forma non grave (per l'in-

tervento precoce della sieroterapia?) U. I. inoculate 3000. Guarigione. L'esame batteriologico dette bacillo della difterite, stafilococco piogene aureo ed albo, streptococco piogene, bacillo di Koch. Forme bacillari piccole, bene colorate, qualche forma corta, con rigonfiamento a clava. Dopo un mese di stufa si vedevano forme bacillari grandi non bene colorate.

Tossicità del liquido filtrato:

Data d'inoculazione	Animale inoculato	Peso	Tossina inoculata	Risultato
12 magg. 1896	Cavia 1ª	380 gram.	0. 2 °/₀	Sopravvissuta
Id.	Id. 2ª	150 id.	0. 5 °/₀	Morta dopo 13 giorni
20 magg. 1896	Id. 3ª	280 id.	0. 8 °/₀	Morta dopo 7 giorni
Id.	Id. 4ª	250 id.	1. °/₀	Morta dopo 4 giorni

Dose minima mortale 0. 01.

Caso XVI. (30 marzo 1896). Capocci Giulio di anni 3 (Ospedale). Localizzazione alle fauci e naso. Adenopatie considerevoli. Forma discretamente grave. Raccolta del materiale ed inizio della sieroterapia in VIII giornata. U. I. iniettate 3000. Guarigione. L'esame batteriologico dette bacillo di Loeffler e streptococco (rare colonie). Forme bacillari piccole, benissimo colorate. Dopo un mese di stufa non si vedevano che forme grandi, a clava, non uniformemente colorate. Tossicità del liquido filtrato:

Data d'inoculazione	Animale inoculato	Peso	Tossina inoculata	Risultato
10 magg. 1896	Cavia 1ª	260 gram.	0. 2 °/₀	Sopravvissuta
Id.	Id. 2ª	240 id.	0. 5 °/₀	Id.
Id.	Id. 3ª	240 id.	0. 7 °/₀	Id.
29 magg. 1896	Id. 4ª	320 id.	1. °/₀	Morta dopo 6 giorni
Id.	Id. 5ª	230 id.	1. 5 °/₀	Morta dopo 6 giorni
Id.	Id. 6ª	260 id.	2. °/₀	Morta dopo 4 giorni
Id.	Id. 7ª	300 id.	3. °/₀	Morta dopo 2 giorni

Dose minima mortale 0. 02.

Caso XVII. (30 marzo 1896). Capocci Andrea di anni 5 fratello del precedente. (Ospedale). Localizzazione alle fauci, adenopatie gravi seguite da suppurazione. Forma clinica molto grave. Raccolta del materiale e sierote-

rapia in VII giornata. U. I. iniettate 4000. Guarigione. L'esame batteriologico dette bacillo di Loeffler, streptococco piogeno, e scarse colonie di stafilococco piogeno aureo. Forme bacillari piccole, bene colorate. Dopo un mese di stufa si avevano solo bacilli grossi, lunghi, terminati a clava, non uniformemente colorati. Tossicità del liquido filtrato :

Data d'inoculazione	Animale inoculato	Peso	Tossina inoculata	Risultato
16 magg 1896	Cavia 1ª	260 id.	0.2 °/₀	Sopravvissuta
Id.	Id. 2ª	270 id.	0.5 °/₀	Id.
Id.	Id. 3ª	300 id.	0.8 °/₀	Morta dopo 8 giorni
Id.	Id. 4ª	290 id.	1. °/₀	Morta dopo 3 giorni
Id.	Id. 5ª	320 id.	1. °/₀	Morta dopo 4 giorni

Dose minima mortale 0. 01

Caso XVIII (4 aprile 1896). Manfredi Ines di anni 2 (Ospedale). Localizzazione alle fauci ed alla laringe. Adenopatie notevoli. Nefrite. Forma molto grave. Presa del materiale ed inizio della sieroterapia in II giornata. U. I. iniettate 6000. Guarigione. L'esame batteriologico dette bacillo difterico, e rarissime colonie di streptococco, e di stafilococco piogeno aureo. Forme bacillari piccole, bene colorate. Dopo un mese di stufa si vedevano solo bacilli grossi, lunghi, terminati a clava. Tossicità del liquido filtrato:

Data d'inoculazione	Animale inoculato	Peso	Tossina inoculata	Risultato
25 magg. 1896	Cavia 1ª	270 gram.	0.2 °/₀	Sopravvissuta
Id.	Id. 2ª	260 id.	0.5 °/₀	Id.
30 magg. 1896	Id. 3ª	300 id.	0.7 °/₀	Morta dopo 4 giorni
Id.	Id. 4ª	290 id.	1. °/₀	Morta in 48 ore

Dose minima mortale 0. 007.

Caso XIX. (23 aprile 1896). Zappi Umberto di anni 1 (Ospedale). Localizzazione alle fauci, bocca, faringe, naso, laringe, bronchi, polmoni. Pericondrite nasale suppurata, ascesso al labbro superiore. Bronco polmonite. Strepto-stafilococcemia. Forma clinica estremamente grave. Raccolta del materiale ed inizio della sieroterapia in IV giornata. Nuovo materiale fu raccolto dopo la morte. U. I. iniettate 4000. Morte. L'esame batteriologico fatto in vita dette bacillo di Loeffler non abbondante, abbondantissimo lo

stafilococco piogeno aureo, scarso lo stafilococco piogeno albo e lo streptococco. L'esame batteriologico post mortem dette bacillo di Loeffler, ed abbondanti lo streptococco e lo stafilococco aureo. Questi due ultimi microrganismi furono trovati abbondantissimi nel sangue del cuore, nei polmoni, nella milza, nel pus degli ascessi. Inoculato lo stafilococco aureo in due cavie le uccise in 24 ore, producendo un flemmone esteso a tutto l'addome ed al dorso. Anche lo streptococco produsse ascesso e morte degli animali, ma meno rapidamente.

Il bacillo di Loeffler isolato durante la vita mostrava forme di media grandezza, con predominio di forme grosse e clavate, ma bene colorate. Dopo un mese di stufa apparivano soltanto le forme grandi, non più colorabili uniformemente. Quello isolato post mortem presentò la stessa morfologia. La tossicità dei liquidi filtrati di coltura dette i seguenti risultati:

Bacillo isolato in vita.

Data d'inoculazione	Animale inoculato	Peso	Tossina inoculata	Risultato
2 giug. 1896	Cavia 1ª	320 gram.	0. 2 °/₀	Sopravvissuta
Id.	Id. 2ª	310 id.	0. 5 °/₀	Morta dopo 6 giorni
Id.	Id. 3ª	250 id.	0. 7 °/₀	Morta dopo 4 giorni
Id.	Id. 4ª	300 id.	1. °/₀	Morta dopo 48 ore

Dose minima mortale 0. 007.

Bacillo isolato post mortem.

9 giug. 1896	Cavia 5ª	300 gram.	0. 5 °/₀	Morta dopo 20 giorni
Id.	Id. 6ª	260 id.	0. 7 °/₀	Morta dopo 15 giorni
Id.	Id. 7ª	300 id.	1. °/₀	Morta dopo 10 giorni
Id.	Id. 8ª	500 id.	2. °/₀	Morta dopo 8 giorni
Id.	Id. 9ª	275 id.	3. °/₀	Morta dopo 4 giorni

Dose minima mortale 0. 03

Caso XX. (18 maggio 1896). Secchi Angiolina di anni 5 (Ospedale). Localizzazione alle fauci e faringe. Ingorgo ghiandolare. Forma clinica mediocremente grave. Raccolta del materiale ed inizio della sieroterapia in terza giornata. U. I. iniettate 3000. Guarigione. L'esame batteriologico dette bacillo di Loeffler streptococco e scarse colonie di stafilococco piogene aureo. Forme bacillari piccole bene colorate, alcune terminate a clava. Dopo un

mese di stufa vi erano solo forme grandi, alcune grandissime, a clava, non colorate uniformemente. Tossicità del liquido filtrato:

Data d'inoculazione	Animale inoculato	Peso	Tossina inoculata	Risultato
17 giug. 1896	Cavia 1ª	430 gram.	0.2 °/₀	Morta dopo 48 ore
Id.	Id. 2ª	320 id.	0.5 °/₀	Morta dopo 30 ore
19 giug. 1896	Id. 3ª	390 id.	0.1 °/₀	Morta dopo 8 giorni
Id.	Id. 4ª	320 id.	0.08 °/₀	Morta dopo 4 giorni
		Dose minima mortale 0.0008.		

Caso XXI. (4 maggio 1896). De Santis Ernesto di anni 5 (Ospedale). Localizzazione alle fauci ed alla laringe. Forma clinica non molto grave. Raccolta del materiale ed inizio della sieroterapia in III giornata. U. I. iniettate 4400. Guarigione. L'esame batteriologico dette bacillo di Loeffler, e scarsi lo streptococco e lo stafilococco piogeno albo. Forme bacillari piccole non bene colorate. Dopo un mese di stufa si ebbero invece forme grandissime, a clava, non bene colorate. Tossicità del liquido filtrato:

Data d'inoculazione	Animale inoculato	Peso	Tossina inoculato	Risultato
17 giug. 1897	Cavia 1ª	460 gram.	0.2 °/₀	Morta dopo 8 giorni
Id.	Id. 2ª	420 id.	0.5 °/₀	Morta dopo 4 giorni
Id.	Id. 3ª	370 id.	0.7 °/₀	Morta dopo 48 ore
		Dose minima mortale 0.005.		

La tabella che segue riassume i risultati delle esperienze ora descritte e mette sott'occhi in ogni singolo caso la forma bacillare colla tossicità del bacillo medesimo rappresentata dalla dose minima capace di uccidere in 4 giorni un grammo di cavia.

Caso	Batterii associati al bacillo di Loeffler	Forma Bacillare		Dose minima mortale di tossina	Forma clinica
		Dopo 48 ore in agar	Dopo 1 mese in brodo		
I	Streptococco piogeno	Forme piccole e medie. Bene colorate, scarse forme clavate.	Forme baccillari grandi con spari incolori, numerose forme clavate.	0, 005	Discretamente grave. Guarigione.
II	Streptococco piogeno. Stafilococco p. aureo.	Forme piccolissime	Forme di media grandezza, alcune con vacuoli, altre a clava.	0. 005	Mite. Guarigione.
III	Streptococco.	Forme di media grandezza, bene colorate, varie forme grandi ed a clava.	Forme grandi con grosse clave.	0. 002	Grave. Guarigione.
IV	Streptococco.	Abbondanti le forme piccole, molte di media grandezza.	Forme grosse clavate.	0. 0004	Gravissima. Morte.
V	Streptococco p. Stafilococco p. aureo.	Forme grandi, parecchie a clava.	Forme grandissime ed a clava	0. 005	Gravissima. Morte.
VI	Steptococco p. Stafilococco p. aureo Stafilococco p. albo	Forme di media grandezza.	Forme grandi non bene colorate, molte a clava.	0. 007	Gravissima. Morte.
VII	Streptococco p.	Forme piccole non bene colorate.	Forme grandissime a clava.	0. 006	Gravissima. Morte.

Caso	Batterii associati al bacillo di Löffler	Forma Bacillare		Dose minima mortale di tossina	Forma clinica
		Dopo 48 ore in agar	Dopo 1 mese in brodo		
VIII	Streptococco p. Pneumo bacillo di Friedländer.	Forme di media grandezza, molte grosse, a clava.	Forme grandissime bene colorate.	0. 03	Mite. Guarigione,
IX	Streptococco p.	Forme piccole tozze.	Forme grandi, a clava.	0. 007	Gravissima. Morte.
X	Streptococco p. Stafilococco p. aureo. Pneumo bacillo di Friedländer.	Forme di media grandezza, molte grandi.	Forme grandi, con grosse clave.	0. 003	Gravissima. Morte.
XI	Streptococco p. Stafilococco p. aureo.	Forme di media grandezza, molte grosse con vacuoli.	Forme grandi a clava.	0. 007	Gravissima. Guarigione.
XII	Streptococco p. Pneumo bacillo di Friedländer.	Forme grandi, molte a clava con vacuoli.	Forme grandissime non bene colorate.	0. 002	Mite. Guarigione.
XIII	Streptococco p. Pneumo bacillo di Friedländer.	Forme grandi con vacuoli.	Forme grandi non colorate uniformemente.	0. 002	Grave. Guarigione.
XIV	Streptococco p. Pneumo bacillo di Friedländer. Bacillo tub. di Koch.	Forme piccole benissimo colorate.	Forme grandissime poco colorate.	0. 01	Gravissima Morte.

Caso	Batterii associati al bacillo di Loeffler	Forma Bacillare		Dose minima mortale di tossina	Forma clinica
		Dopo 48 ore in agar	Dopo 1 mese in brodo		
XV	Streptococco p. Stafilococco p aureo. Stafilococco p. albo. Bac. tub. di Koch.	Forme piccole, frequenti forme a clava.	Forme grandi.	0. 01	Mite. Guarigione.
XVI	Streptococco p.	Forme piccole benissimo colorate.	Forme grandi, a clava, non colorate uniformemente.	0. 02	Grave. Guarigione.
XVII	Streptococco p. Stafilococco p aureo.	Forme piccole bene colorate.	Forme grandi a clava.	0. 01	Grave. Guarigione.
XVIII	Streptococco p. Stafilococco p. aureo.	Forme piccole bene colorate.	Forme grandi clavate.	0. 007	Grave. Guarigione
XIX	Streptococco p. Stafilococco p. albo. Stafilococco p aureo.	Forme di media grandezza, numerose le grandi a clava.	Forme grandi non bene colorate	0. 007	Gravissima. Morte.
XX	Streptococco p. Stafilococco p. aureo.	Forme piccole, alcune e clava.	Forme grandi, alcune grandissime a clava.	0. 0008	Grave. Guarigione.
XXI	Streptococco p. Stafilococco p albo.	Forme piccole, alcune non bene colorate.	Forme grandissime a clava.	0. 005	Mediocremente grave. Guarigione.

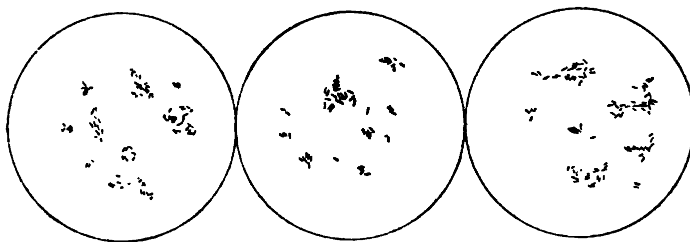
Dall'insieme di queste esperienze la prima conseguenza che ci pare risulti evidente è il nessun rapporto che esiste tra la tossicità del bacillo di Loeffler e la modalità di forma che il medesimo possa presentare nei prodotti difterici e nelle colture. Sia che i bacilli presentino la forma piccola, o la media o la grande, sia che si mostrino disposti parallelamente od a *V* o ad *L*, o variamente ed irregolarmente intrecciati, che presentino o no la forma clavata, ecc. qualunque sieno le condizioni di forma, o di disposizione, possono mostrarsi forniti di vario potere tossico nei loro prodotti. Così vediamo che il liquido filtrato da colture di bacilli piccoli, corti, ha dato un grado di tossicità rappresentato da un massimo di 0,005 (casi II e XXI) ad un minimo di 0,02 (caso XVI). E precisamente negli otto casi in cui l'esame batteriologico rilevò solo forme piccole il grado di tossicità fu rappresentato da 0,005 (casi II e XXI), 0,006 (caso VII), 0,007 (casi IX e XVIII), 0,01 (casi XIV e XVII) e 0,02 (caso XVI). Nel caso di forme medie la tossicità fu di 0,007 (caso VI). In tre casi di forme esclusivamente grandi avemmo 0,002 (casi XII e XIII) e 0,005 (caso V). I due casi di forme miste piccole e medie ci dettero 0,0004 (caso IV) e 0,005 (caso I). I due di forme miste piccole e grandi ci dettero 0,0008 (caso XX) e 0,01 (caso XV). E finalmente nei cinque casi di forme miste medie e grosse vediamo da un massimo di tossicità di 0,002 (caso III) discendere a 0,003 (caso X), a 0,007 (casi XI e XIX) fino a 0,03 (caso VIII) che rappresenta il grado di tossicità meno elevato di tutte le nostre osservazioni, malgrado che dalla forma bacillare si sarebbe dovuto diagnosticare un grado molto forte di tossicità. È così che vediamo lo stesso grado di tossicità p. es. il 0,007 comune alle forme piccole (casi IX e XVIII) alle forme medie (caso VI) ed alle forme miste grosse e medie (casi XI e XIX); e la stessa osservazione può ripetersi per gli altri gradi di tossicità.

Ripetiamo per conseguenza che la varia forma bacillare nulla dice in rapporto alla maggiore o minore potenza patogena del bacillo di Loeffler, e che non è assolutamente possibile di stabilire il grado maggiore o minore di gravezza ed il pronostico in genere dalla forma che il bacillo presenta sia nei prodotti difterici sia nei primi terreni in cui lo si coltiva. Ed agirebbe molto leggermente, per non dire colposamente quel medico che giudicasse della morfologia del bacillo, sulla opportunità o no di intervenire terapeuticamente col siero antidifterico. Qualunque sia la forma, qualunque la sua disposizione, quando esiste il bacillo di Loeffler si deve quanto prima è possibile, ed energicamente intervenire colla sieroterapia, perchè vedemmo, malgrado la sola esistenza di forme bacillari piccole, aversi casi clinicamente gravi e mortali, ed

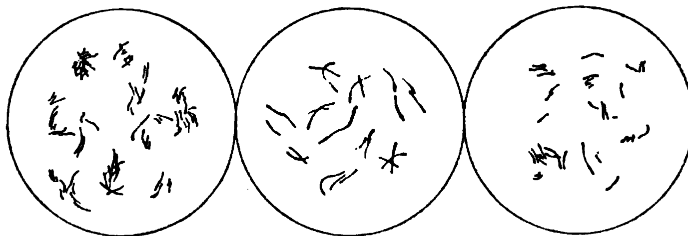
aversi dei prodotti tossici di alto potere patogeno nè più nè meno che colle forme grosse.

Noi abbiamo veduto che, sempre e costantemente, nelle colture in brodo, vecchie di un mese, le forme bacillari grandi che non bene si coloriscono, che terminano a clava, sono le uniche ad osservarsi, qualunque sia stata la forma bacillare primitiva con cui il brodo era stato inquinato. Nelle vecchie colture le forme piccole scompaiono ed anche le medie si fanno scarse, per trasformarsi tutte nelle grosse forme bacillari. Diamo qui alcune figure di preparati prese a caso, essendosi ripetuta in ogni osservazione la stessa trasformazione:

Dopo due giorni in agar a 36°.



Dopo un mese in brodo a 36°.



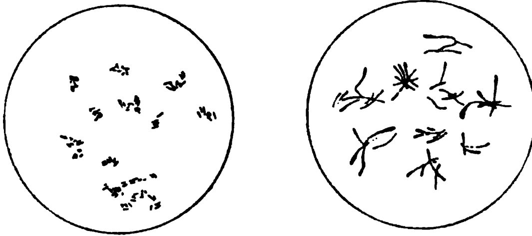
Finora queste forme grosse sono state considerate come prodotto di sviluppo abnorme. Secondo Flügge esse sono specialmente interessanti perchè forse gettano un poco di luce sulle parentele dei bacilli a cui appartiene il gruppo della difterite. Forme perfettamente analoghe accadono eccezionalmente nel gruppo della tubercolosi e regolarmente nelle streptotrices, da far pensare ad un legame filogenetico tra questi tre gruppi, al che si aggiunge il legame del carattere di lento sviluppo, del colorirsi col Gram, ecc. [1] Potrebbero per conseguenza tali forme grosse venire considerate come forme regressive con ritorno atavistico,

---

[1] Flügge. *Die Mikroorganismen.* Vol. II, Leipzig, 1896, pag 460.

se non si vuole ritenerle per forme involutive, di degenerazione del bacillo difterico. Abbiamo veduto ehe esse compariscono e restano, esse esclusivemente, nei terreni di coltura, mano mano che invecchiano; e dopo un mese di stufa, quando già esse si avvicinano alla morte, nei brodi non si hanno più che forme grandi.

Vi è ancora un'altra condizione che facilita rapidamente il passaggio dalle forme piccole alle forme grandi. Studiando i rapporti fra bacillo di Loeffler e streptococchi abbiamo veduto come facendo vivere insieme questi due microrganismi sopra uno stesso terreno solido, su agar agar glicerinato, dopo solo 4 giorni si nota che le forme bacillari piccole primitive sono tutte trasformate in forme grandissime, clavate, come apparisce dal seguente preparato:



E ciò che è più notevole è il fatto che passando queste forme giganti dall'agar sul siero di sangue di vitello, successivamente si ritorna alle forme bacillari piccole primitive. Deve dirsi che le condizioni sfavorevoli di vita in cui il bacillo si trova a vegetare, influiscano sul suo sviluppo in modo da rendere più rapido il suo periodo di invecchiamento.

Un'altra osservazione risulta dai nostri esperimenti, ed è l'influenza del terreno su cui attecchisce il bacillo di Loeffler sulla sua tossicità. Nei casi III e IV si trattava di due fratelli colti contemporaneamente da difterite, e che per ciò devono essere stati contagiati, dalla stessa fonte, dallo stesso microrganismo. In ambedue si aveva la stessa associazione batterica dello streptococco piogene. La raccolta del materiale si fece presso a poco alla stessa epoca di malattie (3^a e 4ª giornata). Medesima fu la localizzazione, salvo che in uno dalle fauci si estese alle narici, senza interessamento laringeo. Ora nel primo, cominciato a curare in 4^a giornata, e con 3000 U. I. si ebbe la guarigione, e la tossicità della tossina era rappresentata da 0,002, mentre nel secondo, malgrado la cura fosse iniziata al 3° giorno e con 5500 U. I. si ebbe la morte e la tossicità del liquido filtrato fu di 0,0004. Ossia in questo

secondo la tossicità del bacillo di Loeffler acquistò un potere patogeno cinque volte maggiore che nel primo. Devesi dunque dire che il terreno su cui il bacillo di Loeffler attecchisce, influisce molto sulla sua tossicità. In questo secondo caso si trattava di un bambino di un anno, mentre nel primo si era già raggiunta l'età di 8 anni. Ora si sa che uno dei fattori che determinano il variare del pronostico nella difterite è dato dall'età, sia che questa influisca sulla resistenza e sulla reazione alle cause morbigene, sia che col progredire degli anni si vengano a stabilire certe immunità di cui non sappiamo rintracciare la causa, e che potrebbero anche essere indotte da leggere, inavvertite influenze tossiche succedutesi a varie epoche della vita.

Queste idee potrebbero trovare una conferma anche da qualche altra nostra osservazione. Nei casi XI e XIX l'esame della tossicità del bacillo di Loeffler si fece durante la vita in 2ª e 4ª giornata di malattia e dopo la morte avvenuta dopo 10-5 giorni dalla presa del primo materiale. In ambedue i casi si trovò che la tossicità del bacillo isolato *post mortem* era molto diminuita. Infatti nel 1° caso da 0,007 si era scesi a 0,01: nel secondo caso pure da 0,007 si era scesi nientemeno che a 0,03. Si doveva dunque dire che la potenza patogena in questi due casi si era venuta attenuando, e ciò crediamo per la influenza della sieroterapia. Nel primo caso erano state iniettate in 10 giorni 6000; e nel secondo 4000 U. I. in 5 giorni. Anche altre volte avevamo notato come ripetendo l'esame batteriologico dopo alcuni giorni dall'inizio della sieroterapia, il bacillo di Loeffler si mostrava attenuato nel suo potere patogeno. Ciò nei casi che volgevano alla guarigione poteva ricevere una facile spiegazione. Ma in questi due casi terminati con la morte la cosa restava meno concepibile. Eppure se si considera la questione da un punto di vista non tanto superficiale e non esclusivamente unilaterale anche di questi due casi si può trovare una ragione convincente non solo, ma vi si trova la conferma di quanto uno di noi in altri lavori ha sostenuto, che cioè la difterite deve considerarsi come un fatto molto complesso in cui entrano in gioco, il bacillo di Loeffler, le associazioni batteriche, e l'organismo malato con i suoi vari gradi di resistenza locale e generale; come pure si trova la conferma che gli insucccessi della sieroterapia antidifterica nella massima parte dei casi sono dovuti a cause estranee alla sieroteroterapia medesima. [1] In questi due casi sotto l'influenza della sieroterapia la

---

[1] Concetti L. *Beobachtungen Ueber Pathogenese und Therapie der diphteritis*. Allg. Wien. med. Zeitung, 1894.

Nuove osservazioni sulla sieroterapia antidifterica. Bull. della R. Accad. Med. di Roma, 1895.-96. Fasc. VII.

forma clinica della difterite si era venuta evidentemente migliorando: gli essudati si limitavano ed in parte non riproducevano, le adenopatie si riducevano notevolmente, la respirazione laringea era più libera. Ma in ambedue un processo di bronco-pulmonite impose per suo conto un aggravamento del processo morboso, e nel secondo fu messa in evidenza una setticoemia stafilo-streptococcica. Anche altre volte avevamo avuto occasione di osservare tali fatti, ma tali osservazioni erano state più superficiali, e fatte solo dal punto di vista clinico; e la ricerca batteriologica si era limitata alla constatazione della presenza di un bacillo di Loeffler virulento. Anche la esistenza delle associazioni microbiche era stata da noi constatata.

Ma rimaneva sempre indecisa la questione, di sapere sino a qual punto queste associazioni dovessero essere incolpate, e quale importanza conservasse la infezione difterica. In questi due casi abbiamo potuto dimostrare come la infezione difterica veniva cedendo, come sempre, il terreno di fronte alla sieroterapia, tanto da avere non solo il miglioramento della località malata, ma da poter constatare la diminuzione di tossicità dei prodotti del bacillo di Loeffler, tanto che p. es. nel secondo caso, come dicemmo si scese da 0.007 a 0.03, ossia si ebbero dei prodotti 4-5 volte meno tossici. Per quello poi che riguarda le associazioni batteriche, nel primo caso (XI) si isolò uno streptococco piogene che inoculato nel peritoneo di una cavia portò la morte in 24 ore con peritonite e pleurite fibrino purulenta e numerosi streptococchi negli essudati e nel sangue del cuore. Nel secondo caso (XIX), mentre lo streptococco isolato si mostrò pochissimo patogeno, per converso si isolò uno stafilococco piogene aureo che inoculato sotto cute in due cavie le uccise in 24 ore producendo un flemmone esteso a tutto l'addome ed al dorso. Ora in questi casi è dimostrata alla evidenza la importanza delle associazioni batteriche nella difterite e la causa di alcuni insuccessi della sieroterapia.

Ma se, come vedemmo, la morfologia del bacillo di Loeffler non ci serve come criterio pronostico della mitezza o della gravità del caso clinico, lo stesso possiamo dire, benchè in minime proporzioni del grado di tossicità dei prodotti del bacillo stesso. Ossia, avendo un bacillo che segrega prodotti tossici poco elevati non siamo autorizzati e dire che quel caso decorrerà mite e verso la guarigione; e viceversa avendo prodotti molto tossici non possiamo dedurne la gravezza della forma clinica. È così che vediamo nelle nostre esperienze che lo stesso grado di tossicità ci vien dato da bacilli isolati in forme miti ed in forme gravissime. P. es. la dose minima mortale di 0.005 ci è stata data da un caso mite terminato in guarigione (II), da due discretamente gravi ma

pure essi guariti (I-XXI) e da un caso gravissimo terminato colla morte (V). Così mentre abbiamo registrato un caso mite guarito rapidamente con 0.002 di tossicità, ne abbiamo uno gravissimo terminato da morte con solo 0.01. E di tali esempi se ne potrebbero riferire altri desumendoli dalla tabella sopra esposta. È questa ancora una prova che alla determinazione del quadro clinico della difterite non concorre soltanto il bacillo di Loeffler, ma oltre alle associazioni batteriche sopra ricordate vi concorre anche il grado di resistenza individuale dell'organismo.

L'esame batteriologico che, nella difterite specialmente, ha assunto una importanza così notevole tanto da non potersene giammai esimere nello studio di ogni singolo caso, non deve per conseguenza far dimenticare la clinica, perchè in ogni caso speciale la forma clinica, l'andamento della malattia, il suo esito, il rispondere o no alla cura specifica, dipendono da una quantità e da un insieme di fattori che le ricerche di laboratorio non ci possono completamente rivelare. Però dobbiamo dire che nella maggior parte dei casi le indagini batteriologiche si fanno troppo superficialmente. Non basta svelare la presenza del bacillo di Loeffler. Bisogna studiarne la virulenza ed il grado di tossicità dei suoi prodotti. Bisogna studiare, non solo limitandosi a costatarne la presenza, ma vedere quale e quanto potere patogeno abbiano tutti e singoli gli altri microrganismi che a quello di Loeffler si trovano associati. E queste ricerche in ogni caso dovrebbero ripetersi nel corso della malattia anche parecchie volte, ed anche ad esito avvenuto o colla morte o colla guarigione. E sarebbe desiderabile che questo studio potesse completarsi colla ricerca del potere antitossico del siero sanguigno nei vari periodi della malattia (cosa non facile nella pratica trattandosi di bambini). In questo modo, e solo in questo modo, la batteriologia potrebbe rendere i più grandi servigi alla clinica, e potrebbesi così rendersi ragione di una quantità di modalità, e di fatti apparentemente contradittori ed in parte inesplicati, che tutto giorno si incontrano nella pratica, compresi molti così detti insuccessi della sieroterapia. Ci auguriamo che questo piccolo nostro contributo valga a dilucidare alcuni di questi fatti, o per lo meno valga a spronare su questa via gli studiosi per ricerche più accurate e più complete.

Istituto d'Igiene sperimentale di Montevideo

SULL'AGGLUTINAZIONE COME MEZZO DIAGNOSTICO

DEL BACILLO TIFICO

PER I DOTTORI

E. PUPPO
Preparatore all'Istituto d'Igiene di Montevideo

V. OTTONI
Preparatore alla Facoltà di Medicina di Rio De Janeiro

Allorquando Loesener[1] in un lungo ed accurato lavoro riassumeva e criticava le 689 memorie pubblicate in proposito dopo Eberth, Koch e Gaffky, e stabiliva la necessità di caratteri multipli per ottenere la diagnosi del bacillo tifico, Pfeiffer[2] segnalava un nuovo metodo che sarebbe capace da solo a permettere la diagnosi tanto desiderata.

Si sentiva infatti il bisogno di un nuovo segno, perchè da molte parti si era constatato che, malgrado le numerose condizioni imposte ad un germe per identificarlo con la causa della febbre tifoide, se ne trovavano tuttavia alcuni nell'assenza completa di questa malattia, che non potevano differenziarsi dal bacillo tifico, e si cominciava quindi a pensare alla possibilità di uno stato saprofitico di questo microrganismo, analogo a quello che i lavori di Sanarelli han lasciato intravedere per il vibrione colerico.

Pfeiffer, basandosi sulle ricerche di Stern e Neisser, i quali erano riusciti a produrre l'immunità degli animali col siero di convalescenti di febbre tifoide, cercò di ottenere per questa malattia una reazione simile a quella ch'egli aveva ottenuto col vibrione colerico.

Dopo aver praticato delle esperienze comparative col siero di individui che non avevano mai avuto la febbre tifoide, egli trovò che, solamente col siero di convalescenti di questa malattia e con quello di capre immunizzate, i bacilli tifici divenivano immobili, diminuivano rapidamente e mostravano delle forme degenerative e delle trasformazioni in granuli.

Con i colibacilli, anche impiegando delle dosi più forti di siero,

[1] *Arbeiten aus dem Kais. Gesundheits.* Bd. XII, 18'5, pag. 207

[2] Zeitschr. für Hygiene, etc. Bd. XXI, 1896, pag. 208.

non si riusciva nè a salvare le cavie nè ad ottenere la suddetta trasformazione.

Tale proprietà, secondo Pfeiffer, sarebbe dovuta alla reazione dei succhi del corpo sul siero immunizzante e sarebbe assolutamente specifica.

Essa gli è stata sufficiente per accettare come veri bacilli tifici, dei microbi isolati da Loesener dalle feci normali, dal suolo e dall'acqua della conduttura di Berlino.

Costituendo la provenienza di questi germi, il solo dubbio relativo alla loro natura, Pfeiffer, di fronte alla reazione del siero, non esita ad affermare la loro identità col bacillo tifico ed a condividere la concezione di Loesener, secondo la quale, i germi tifici sarebbero grandemente diffusi nell'ambiente, anche allo infuori di ogni malattia tifogena.

Max Gruber,[1] in collaborazione con Durham, riprende la questione e conferma in parte le idee di Pfeiffer, ma considera esagerate le sue conclusioni relativamente ad una specificità assoluta della reazione. Gruber crede che l'azione immunizzante è dovuta, nei sieri, alla presenza di un corpo ch'egli chiama *glabrificina*, e che avrebbe la proprietà di distruggere la membrana dei corpi bacillari; questi diverrebbero allora vischiosi, agglutinandosi in ammassi e perdendo i movimenti propri.

Una volta sottomessi a questa azione, essi sono facilmente attaccati dalle *alexine* di Buchner che non hanno nulla di specifico e che si trovano sempre nei succhi organici.

L'azione principale è dunque l'azione della *glabrificina;* è dessa la causa della specificità del siero. Ad ogni varietà di microbi corrisponde una *glabrificina* specifica.

Partendo da questi principî Gruber propone di fare la reazione dell'agglutinamento *in vitro*, ciò che semplifica la tecnica risparmiando le inoculazioni nel peritoneo degli animali.

Una serie di germi sottoposti a queste prove ha subito convinto l'autore che la reazione poteva prodursi anche con specie affatto diverse: il *bacterium enteritidis* di Gärtner subirebbe un'azione simile a quella del bacillo tifico, ma riconoscendo al tempo stesso che la reazione su quest'ultimo è più pronunciata, egli crede le differenze abbastanza grandi per poter conservare l'agglutinamento come un mezzo diagnostico efficace.

---

[1] Munch. med Wochenschr, 1896. Ref. Centralblatt f. Bakt. Bd. 19.

Gli studi di Loeffler e di Abel,[1] di Sobernheim[2] e di altri, recarono intanto nuove conferme e lo fecero accettare in Germania per la diagnosi bacteriologica del bacillo tifico, malgrado le numerose obbiezioni che gli si potevano fare, come si facevano alla diagnosi del colera mercè il fenomeno di Pfeiffer, ed in Francia si applicava alla diagnosi clinica della febbre tifoide.

Widal[3] verifica la reazione in una serie di ricerche col virus di ammalati di febbre tifoide, ed afferma la sua specificità che permette di stabilire con certezza la diagnosi di questa malattia ogniqualvolta il siero di un ammalato determini l'agglutinamento delie culture del bacillo d'Eberth.

Dieulafoy[4] conferma le osservazioni di Widal, producendo la reazione col siero di due ammalati mentre approdava a dei risultati negativi col siero di persone esenti da febbre tifoide.

Il valore di questa reazione per la diagnosi clinica è ancora basato sui risultati positivi di Achard,[5] Lemoine, Siredey e Menetrier,[6] Vedel,[7] Hanshalter,[8] e sull'assenza della reazione nei casi dubbi di ammalati che l'osservazione ulteriore dimostrava appartenere ad altri processi morbosi, secondo le osservazioni di Rendu,[9] Achard,[10] Lemoine[11] e Vedel.[12]

Courmont[13] reca una nuova conferma sperimentale a queste idee, osservando non solamente nove reazioni positive in nove casi sicuri di febbre tifoide, ma constatando altresì che altri sieri antidifterico e antistreptococcico) sono senza azione sulle culture del bacillo di Eberth.

Questi studi, eseguiti in Francia, tendono soprattutto a dimostrare la validità del mezzo per la diagnosi clinica della febbre tifoide. Solamente con altro ordine di studi si cercò di approfondire la diagnosi bacteriologica del bacillo tifico.

---

[1] Centralblatt für Bakt., ecc. 1 Abt. Bd. XIX, 51.
[2] Hygienische Rundschau, 1896, 803.
[3] Semaine médicale, 1896, pag. 259.
[4] Id, id., pag. 266.
[5] Id., id, pag. 295.
[6] Id, id., pag. 296.
[7] Id, id., pag. 312.
[8] Id, id., pag. 312.
[9] Id., id., pag. 269.
[10] Id., id, pag. 303.
[11] Id, id, pag. 303.
[12] Id., id, pag. 312.
[13] Id., id., pag. 293.

Già Courmont aveva verificato che il siero di un tifoso può dare una reazione molto marcata sulle culture del *colibacillo*, del bacillo di Loeffler e dello streptococco.

Da questi fatti egli concluse che la reazione di un siero tifico sopra una cultura non prova che si sia in presenza del bacillo di Eberth e che solamente l'agglutinamento di questo germe prodotto da un siero *« sembrerebbe riscontrarsi solo nei casi di febbre tifoide »*.

Achard e Bensande [1] constatono delle differenze nella maniera di reagire dei diversi campioni del bacillo di Eberth, e verificano che vi sono delle specie vicine che reagiscono in una maniera analoga. Fra queste essi segnalano tre germi i cui caratteri coincidono con quelli del bacillo tifico e per i quali non potè trovare delle differenze sensibili dal punto di vista dell'agglutinamento.

Questi germi sono dei bacilli isolali: uno dall'urina purulenta di una donna, l'altro da-una artrite sviluppata in seguito ad una malattia acuta mal determinata, ed il terzo era il bacillo della psittacosi.

Sembrando un po' compromessa la specificità della reazione, Widal e Sicard [2] sono costretti a riconoscere che l'azione agglutinante può altresì ottenersi con specie vicine, ma cercano stabilire che essa è sempre meno energica che con la specie infettante.

Propongono quindi d'impiegare delle diluzioni di siero molto più deboli di quelle all' $^1/_{10}$ proposte da principio.

È così che con diluzioni di siero all' $^1|_{40}$ e $^1|_{60}$ poterono vedere l'agglutinamento prodursi solo col bacillo tifico.

La specificità era dunque ridotta ad una questione di grado come Gruber e Durham avevano già affermato.

Remlinger e Schneider, [3] considerando ciò che si verifica per il vibrione colerico, dubitano che la prova negativa di un siero possa servire a definire la natura di un microbio, pur tuttavia riconoscono con Widal che, impiegando una dose minima, *la prova del siero fornisce un eccellente metodo di differenziazione.*

*
* *

Questo piccolo riassunto storico, le esitazioni di Remlinger e Scheider segnalate nel loro recente lavoro, c'inducono a credere che la questione della specificità della reazione agglutinante non sia ancora definita.

Però la questione della diagnosi sicura del bacillo tifico è di una im-

---

[1] Semaine médicale, 1896, pag. 480.
[2] Id, id., pag. 488.
[3] Annales de l'Institut Pasteur. Janvier, 1897.

portanza così grande, che noi abbiamo creduto utile di recare come contributo alla sua eliminazione il riassunto di ricerche condotte da qualche tempo nell'Istituto d'Igiene sotto la direzione del prof. Sanarelli.

Noi abbiamo sottoposto alla reazione di Grüber–Durham dei germi isolati da cadaveri di febbre gialla dal nostro maestro, durante le sue ben note ricerche sulla causa di questa malattia.

Questi germi presentavano: alcuni i caratteri del bacillo tifico, ed altri i caratteri del gruppo *coli*.

Infatti Sanarelli, durante le sue ricerche sui cadaveri di febbre gialla, in mezzo a molti altri microbi, riuscì ad isolare, sopratutto dal tubo digestivo, 13 varietà di bacilli aventi tutti i caratteri del bacillo tifico, vale a dire: uguale morfologia nei differenti mezzi nutritivi, aspetto tipico sulle piastre di gelatina, reazione negativa dell'indolo, assenza di potere fermentativo sul lattosio, azione patogena sugli animali, ecc.

A lato di queste 13 varietà di bacilli pseudo-tifici, Sanarelli, ha isolato altre 10 varietà microbiche aventi tutti i caratteri dei *colibacilli*, vale a dire: uguale morfologia, reazione dell'indolo, fermentazione del lattosio, coagulazione del latte, azione patogena, ecc.

Sorpreso della frequenza relativa dei bacilli pseudo-tifici nel contenuto intestinale di persone morte di tutt'altra malattia che la febbre tifoide, il prof. Sanarelli ce ne ha affidato lo studio, specialmente dal punto di vista della loro diagnosi differenziale con bacilli tifici autentici, isolati da milze di tifosi, mediante il siero di animali vaccinati contro qualcuno di questi.

Come siero anti-tifico, noi abbiamo dunque impiegato quello di alcune cavie vaccinate da molto tempo contro un bacillo tifico proveniente dal laboratorio del dott. Roux e col quale Sanarelli aveva antecedentemente condotto la maggior parte dei suoi studi sulla febbre tifoide.

Queste cavie avevano ricevuto complessivamente durante i loro otto mesi di vaccinazione, 132 cm. c. di culture virulente: potevano quindi considerarsi come ipervaccinate.

Gli altri campioni di bacilli tifici impiegati durante le nostre ricerche erano stati isolati da cadaveri di tifosi: uno dal prof. Sanarelli a Siena, l'altro dal dott. Silberomith a Zurigo.

Abbiamo cercato dapprima la dose minima di siero antitifico, ottenuto col bacillo di Parigi, per mezzo della quale si riusciva a produrre il fenomeno, ed abbiamo constatato che si giungeva ad ottenerla nettamente e in breve tempo con $^1|_4$ di goccia diluita in due cm. c. di brodo, vale a dire, con una soluzione al 320°.

Questa dose era la metà più piccola di quella indicata da Schneider e Remlinger e molto più debole di quella consigliata dallo stesso Widal.

L'azione di questo siero sugli altri campioni di bacilli tifosi autentici ci ha dato il seguente risultato:

TABELLA I.

	Bac. tifico di Parigi	Bac. tifico di Firenze	Bac. tifico di Siena	Bac. tifico di Zurigo
1 ora .	+	+	comincia	—
1 1/2 id. .			più netta	comincia
2 id. .			—	più netta
4 id. .			+	+

Questa tavola ci dimostra che la reazione agglutinante si produce con intervalli variabili fra 1 a 4 ore, secondo la provenienza dei germi tifici, e ci autorizza quindi a considerare come senza valore, dal punto di vista della diagnosi, le differenze sull'apparizione del fenomeno, comparse in questo spazio di tempo.

Abbiamo sempre lavorato servendoci di una cultura in brodo di 24 ore, alla quale si aggiungeva $^1/_4$ di goccia di siero di cavia immunizzata col bacillo autentico, ponendo subito i tubi nella stufa a 37°,5.

L'ora del fenomeno era stabilita allorquando la precipitazione era completa ed il brodo era divenuto completamente chiaro.

Operando esattamente nelle stesse condizioni, noi abbiamo saggiata l'azione di questo siero sui diversi germi provenienti da cadaveri di febbre gialla.

I risultati sono riassunti nella seguente:

TABELLA II.

	Bac. tifico di Parigi	n. 1	n. 2	n 3	n. 4	n. 5	n. 6	n. 7	n 8	n. 9	n. 10	n. 11	n. 12	n. 13
1/2 ora	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1 ora		—	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	+
24 ore		—				—	—	—	—	—	—	—	—	

NB. Non si potè constatare il fenomeno con alcune delle varietà di colibacilli.

Questo gruppo di osservazioni ci mostra dei germi isolati all'infuori di ogni malattia tifica i cui caratteri sono analoghi a quelli del bacillo di Eberth, e che si comportano di un modo sensibilmente eguale anche innanzi al siero specifico.

La differenza di una mezz'ora nell'apparizione del fenomeno è infatti trascurabile, considerando sopratutto la differente maniera di reagire dei germi autentici (Tabella I).

∴

Proseguendo le nostre ricerche, abbiamo utilizzato delle cavie che erano state bene immunizzate con alcune varietà dei nostri bacilli pseudo-tifici, per verificare anche l'azione del loro siero sopra tutti gli altri germi che abbiamo fra mano.

Per ogni sorta di siero impiegato da noi, abbiamo avuto sempre la cura di cercare la dose minima che produceva il fenomeno nel più breve tempo con la specie infettante.

È con questa dose che noi abbiamo proceduto.

I risultati delle nostre osservazioni sono riassunti nella seguente tabella :

		Bacilli eberthiformi													Colibacilli									
		n. 1	n. 2	n. 3	n. 4	n. 5	n. 6	n. 7	n. 8	n. 9	n. 10	n. 11	n. 12	n. 13	n. 1	n. 2	n. 3	n. 4	n. 5	n. 6	n. 7	n. 8	n. 9	n. 10
Siero del bac. Eberthif. n. 6. 1/4 goccia.	15 min.	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	30 id.	—	—	—	—		+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	24 ore	—	—	—	—		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Siero del bac. Eberthif. n. 7. 1/4 goccia.	1 ora	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	—	—	—	—	—
	2 id.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—			—	—	—	—	—
	25 id.	—	—	—	—	—	—		—	—	—	—	—	—		—	—			—	—	—	—	—
Siero del bac. Eberthif. n. 11. 1/2 goccia.	2 ore	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	24 id.	—	—	—	—	—	—	—	—	—		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Siero del colibacillo n. 1. 1/2 goccia.	1 ora	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	24 id.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—		—	—	+	+	—	—	—	—	—
Siero del colibacillo n. 2. 1/2 goccia.	1/2 ora	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—
	24 id.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—		—	—	—	—	—	—	—	—

NB. Tutti questi sieri non produssero alcuna reazione, alle dosi indicate, sui vari campioni di bac. tifici autentici.

Riassumendo i resultati precedenti vediamo adunque che i sieri del bacillo pseudo-tifico n. 11 e dei colibacilli n. 1 e 2 sono assolutamente specifici: vale a dire che non producono la reazione con nessun'altro microbo. Il siero del colibacillo n. 1 agglutina, è vero, anche i colibacilli n. 4 e 5, ma solamente dopo un tempo molto lungo (24 ore).

Il siero del n. 6 agglutina il bacillo Eberthiforme n. 5, $^1|_4$ d'ora avanti di produrre la reazione del microbio infettante.

Lo stesso fatto si osserva col siero del n. 7 che agglutina i colibacilli 4 e 5 in un'ora, mentre ch'esso stesso non è agglutinato se non dopo 2 ore. Si constata ancora che questo ultimo siero produce una agglutinazione facile del colibacillo n. 1 e che il siero di questo colibacillo non agglutina assolutamente il bacillo Eberthiforme n. 7.

Questo ultimo fatto dimostrerebbe che non vi ha sempre reciprocità nella reazione, ma siccome è rimasto isolato nelle nostre ricerche, non possiamo tirarne conclusioni.

La mancanza di reciprocità autorizzerebbe la distinzione che Courmont ha cercato di stabilire.

Abbiamo visto infatti che questo autore pretende che è solamente la agglutinazione delle culture del bacillo tifico quella che ha un carattere specifico, mentre che l'agglutinazione di un microbio, ottenuta mercè il siero anti-tifico, non autorizzerebbe la sua identificazione col bacillo di Eberth.

Noi avremmo potuto verificare il buon fondamento di questa affermazione, immunizzando degli animali con i nostri microbi eberthiformi n. 2, 3, 4 e 13 i quali erano stati agglutinati dal siero tifico e studiando l'azione del siero da essi fornito sui bacilli tifici autentici. Ma abbiamo trascurato di fare queste prove, perchè il nostro scopo era quello di cercare dei mezzi per istabilire la diagnosi bacteriologica del bacillo tifico ed è chiaro che questa diagnosi sarebbe impraticabile se si dovesse, per ogni specie sospetta, immunizzare degli animali per sperimentarne il siero sul bacillo autentico.

Ma questa idea di Courmont non sembra destinata ad avere delle conferme sperimentali.

Già Achard e Bensande [1] hanno potuto verificare l'agglutinazione di alcune specie di bacilli tifici, ottenuta col siero di un ammalato di altra malattia ed osservarono essi stessi, che, in condizioni sperimentali, ed operando con animali immunizzati, si giungerebbe a disporre sicuramente di sieri dotati di un potere agglutinante ancora più efficace, sui bacilli tifici.

---

[1] *Semaine médicale*, 1896, pag. 480.

Da queste esperienze noi dobbiamo ricavare una delle seguenti due conclusioni: *o noi respingiamo la specificità della reazione di* Grüber-Durham *ed allora bisognerà trovare dei nuovi mezzi di differenziamento, oppure saremo obbligati ad ammettere la banalità del bacillo tifico.*

Infatti noi vediamo che, quantunque si aumentino le esigenze per la caratterizzazione di questi germi, ne vediamo tuttavia scaturire, all'infuori di ogni malattia tifogena, e che presentano tutti i caratteri del bacillo di Eberth. Loesener, Schneider e Remlinger ed in questo nostro studio ne hanno digià segnalati diversi.

D'altra parte la specificità della reazione sembra gravemente compromessa dalle nostre esperienze, dalle quali appare, che l'agglutinazione può ottenersi sopra un microbio indifferente con maggiore facilità che sopra il microbio infettante. Le osservazioni di Bordet [1] parlano nello stesso senso, avendo egli ottenuto l'agglutinazione delle culture del bacillo tifico col siero di cavallo normale.

Ma avanti di potere stabilire conclusioni definitive, che noi ci limitiamo a rimettere in discussione, ci sembra che la questione meriti di essere ancora e più estesamente studiata.

---

[1] *Annales de l'Institut Pasteur*, 1896, n 4.

Istituto d'Igiene della R. Università di Palermo

INFLUENZA DELLE LESIONI DEI CENTRI NERVOSI

SULLA IMMUNITÀ PASSIVA

RICERCHE SPERIMENTALI

DEL

Dott. N. PALERMO [1]

L' influenza che esercita l' innervazione sull'attecchimento e sullo sviluppo dei vari processi infettivi è stato, in questi ultimi tempi, argomento di numerosi lavori.

Il sistema nervoso essendo, senza dubbio, il gran sistema dominatore dell'organismo, alle lesioni di esso seguiranno delle alterazioni organiche e funzionali, più o meno gravi, anche a tal grado da modificare la predisposizione alle malattie infettive. Questo concetto ha informato le molteplici ricerche degli sperimentatori, per indagare l' azione del sistema nervoso nelle infezioni, e tra essi mi limito a segnalare Platania, Charrin e Gley, Bouchard, Fraenkel, De Paolis, Charrin e Ruffer, Babinski e Cornil, Ochotine, Dache e Malvoz, Ceni, Hermann, Roger, e più recentemente Giuffrè e Pollaci, [2] Pellizzi, [3] Trambusti e Comba, [4] Lunghini, [5] Piccino e Grimaldi. [6]

---

[1] Sento il dovere di manifestare al prof. L. Giuffrè l' espressione della mia più viva gratitudine per i consigli e per il prezioso ed efficace aiuto apprestatomi nel corso di queste esperienze, e ringrazio ancora riconoscente il prof. Manfredi che mi è stato largo dei suoi consigli, e con ogni benevolenza mi ha concesso gentile ospitalità nell' Istituto da lui diretto.

[2] *Contributo allo studio dell' immunità. Influenza del sistema nervoso sulla infezione.* Memoria I e II. Atti della R. Acc. delle Scien. Med. di Palermo, 1893 e 1894. - Arch. Ital. di Clin. Med., 1895. - Atti del XI Congr. Med. Intern., 1895, ecc.

[3] *Influenza della paralisi vasomotoria e del taglio dei nervi sensitivi sullo sviluppo della inflammazione.* Riv. sper. di Freniatria e Med. leg., 1893.

[4] *Influenza delle alterazioni del sistema nervoso sulla localizzazione e sul decorso dei processi infettivi.* Lo Sperimentale, Sezione Biologica, anno 1895, fasc. III.

[5] *Le lesioni del sistema nervoso centrale nei loro rapporti colla immunità verso le malattie infettive.* Il Policlinico, 1895, n. 24.

[6] *Contributo allo studio dell' influenza del sistema nervoso nelle infezioni.* Riforma medica, 1896, n. 11, vol. I.

La conclusione generale che si ricava da tali studi è, che le alterazioni del sistema nervoso, sia centrale che periferico, determinando in tutto l'organismo o in una parte di esso un *locus minoris resistentiae*, facilitano l' attecchimento e lo sviluppo delle diverse infezioni. Tale azione è così spiccata da sopprimere l' immunità naturale, come è dimostrato dalle esperienze di Giuffrè e Pollaci, in un lavoro che è certamente il più completo su questo importante argomento. [1] Dopo che dalle esperienze di questi AA. è risultato che una lesione del sistema nervoso (centrale e periferico) è capace di sopprimere l' *immunità naturale* che il colombo ha per il carbonchio, era molto opportuno il vedere se eguale risultato si abbia per le diverse *immunità acquisite*.

Avendo però il Lunghini [2] pure ottenuto un risultato simile nei colombi immunizzati contro il vibrione di Metchnikoff *(immunizzazione attiva)*, per consiglio del prof. Giuffrè, mi sono proposto di studiare se e quale azione eserciti una lesione dei centri nervosi [3] sulla immunità alla difterite, che può conferirsi alle cavie per mezzo del siero anti–

---

[1] Merita di essere notato che Trambusti e Comba (i quali estirparono il ganglio celiaco inferiore, iniettarono nell' orecchio delle colture di streptococco dell'eresipela e di stafilococco piogeno aureo, e trovarono delle alterazioni renali) attribuiscono a Giuffrè e Pollaci un'opinione dimostrata erronea, dalle loro stesse esperienze e da larga copia di argomenti svolti nella seconda parte di quel lavoro dal Giuffrè; cioè che « la paralisi vasomotoria abolisce negli animali la refrattarietà ».

[2] Il Lunghini sezionò il midollo spinale della regione dorsale superiore dei colombi vaccinati col vibrione del Metchnikoff, e quindi fece la inoculazione del virus nel muscolo pettorale. Egli, per le sue esperienze, ritiene come causa *sufficiente* della cessazione della immunità la ipotermia determinata dalla lesione nervosa. Questa opinione però non è da accettarsi per svariate considerazioni e per le già note e quasi identiche esperienze di Giuffrè e Pollaci.

E qui credo opportuno rilevare che in tutti i manuali anche italiani si parla, a proposito dell' immunità, dell' ingegnosa teorica vasomotoria del Bouchard, e si tace completamente delle esperienze di Giuffrè e Pollaci, che pure contribuiscono tanto a dimostrarla insostenibile, oltre quelle di Bordet e Massart, di Gley e Charrin ed altri. Anche nel recentissimo manuale del Lustig (*Immunità per le malattie da infezione*, Torino, 1897), mentre a proposito delle lesioni dell' innervazione, capaci di aumentare la predisposizione ai morbi infettivi, si rammentano le esperienze di Trambusti e Comba, di Charrin e Ruffer, dello stesso Lustig, si tace, anche nella bibliografia, di quelle di Giuffrè e Pollaci, che certamente sono tra le più complete e le più dimostrative.

[3] Nelle citate esperienze, Giuffrè e Pollaci praticarono anche delle lesioni nello sciatico; però per avere risultati più netti, oltre che per risparmio di tempo, io mi sono limitato allo studio delle lesioni dei centri nervosi.

difterico uno dei tipi più netti di quella immunizzazione chiamata *passiva* dall'Ehrlich, la quale è ben diversa da quella che i colombi possiedono naturalmente per il bacillo del carbonchio e di quella che possono acquistare colla vaccinazione per il vibrione avicida.

Ho distinto le numerose esperienze eseguite (a parte di quelle preliminari intese a determinare la virulenza del virus o della tossina adoperata ad accertare l'avvenuta immunizzazione) in due gruppi: in un primo in cui in animali immunizzati (nei quali cioè si era praticata da 1-2 ore o da 18–24 ore la iniezione del siero antidifterico) eseguivo la lesione dei centri nervosi (cervello o midollo spinale), e quindi la inoculazione del virus (cultura viva); ed in un secondo gruppo in cui invece di questa praticavo l'iniezione della tossina.

Ho diviso poi ognuno di questi gruppi in due serie; ed ecco come ho proceduto seguendo lo stesso metodo di Giuffrè e Pollaci. In una prima serie di esperienze ho prodotto una lesione (distruzione, taglio) nel cervello o nel midollo spinale e fatta subito dopo nell' arto paralizzato, ossia sottratto in tal modo alla influenza nervosa, l' inoculazione di un'ansa di platino di cultura viva, o l'iniezione di una data dose di tossina. In una seconda serie ho prodotto la stessa lesione e fatta la inoculazione di virus o di tossina non nell'arto paralizzato, ma nel sano, cioè ad innervazione integra.

Prima di esporre il risultato di tali esperienze, premetto poche parole sulla tecnica seguita.

Usavo per immunizzare le cavie il siero antidifterico fornito dall' Istituto Sieroterapico Milanese contenente 1000 U. I. in 10 cmc. di liquido, del quale però avevo cura di saggiare in precedenza la dose minima capace di immunizzare una cavia di 300, 400, 500 gm. E poichè il generale bastavano cmc. 0,02-0,03 per ogni 100 gm. di animale, con cmc. 0,10 di siero ero certo che una cavia del peso medio di 400 gm. era immunizzata contro la minima dose mortale di tossina da me usata (cmc. 0,20), o contro un'ansa di platino della cultura viva.

L'operazione al cervello consisteva nel distruggere attraverso un piccolo foro di trapanazione parte dell'uno o dell'altro emisfero cerebrale per mezzo di una piccola sonda metallica o del termocauterio del Paquelin, quindi, previa emostasi (lieve perchè poca la perdita di sangue), veniva suturata la ferita e spalmata di collodion jodoformizzato. Gli animali tutti presentavano fatti di paresi, più che di paralisi, nel lato opposto a quello dove era stata praticata la lesione, e taluni anche movimenti di maneggio e convulsioni. La mortalità fu relativamente lieve; su n. 30 cavie operate, 25 ne sopravvissero. Queste in generale poco tempo dopo dell' operazione si mostrarono vivaci come prima, e dopo pochi giorni si presentarono in tutto normali, guarite anche della paresi. Il peso delle cavie operate nella mag-

gior parte dei casi diminuiva di poco, ma dopo qualche giorno risaliva: la temperatura rettale subiva un leggero rialzo, che in media non oltrepassava mai il grado, e dopo 2 o 3 giorni ritornava normale.

Per la sezione del midollo spinale fu prescelta la regione dorso-lombare. Fatta un' incisione sino alla rachide e distaccate, se necessario, delle lamine vertebrali, si penetrava con coltellino di Graefe nella cavità rachidiana, recidendo per metà (presso a poco) o per intero il midollo spinale. I fenomeni consecutivi erano la paralisi o paresi degli arti dello stesso lato operato, (se la lesione era unilaterale) e gli animali si mostrarono resistenti abbastanza e vivaci nel decorso post-operativo.

Nella emisezione dopo 8-10 giorni si ebbe guarigione, più tardi e incompletamente nella sezione totale. Queste cavie mostrarono un deperimento più notevole che le altre operate al cervello, il loro peso discese in media di $^{1}/_{6}$ circa, ma risalì dopo 6-7 giorni. La temperatura ebbe un elevamento di quasi un grado, dopo pochi giorni tornò normale.

Il virus di cui mi servivo era una coltura viva in agar di bacillo di Loeffler di 9-10 giorni e la cui virulenza saggiavo contemporaneamente con cavie testimonie. Ne inoculavo un'ansa procurando di prenderne sempre approssimativamente la medesima quantità. La inoculazione era eseguita praticando con un bisturi una piccola saccoccia sotto il derma nel cellulare sottocutaneo e, avendo cura che fosse ben chiusa, proteggendola con uno strato di collodion jodoformizzato.

La tossina era ottenuta da cultura virulenta difterica filtrata al filtro di Chamberland e conservata coll'aggiunta del mezzo per cen·o di fenolo. La tossicità delle tossine adoperate venne saggiata in parecchie cavie: cmc. 0,10-0,20 erano capaci di uccidere in 40 h. una cavia del peso di gm. 450. Furono sempre iniettate delle dosi proporzionali al peso delle cavie, le quali del resto, differendosi di poco tra loro, ebbero iniettate quasi sempre la dose di cmc. 0,10-0,20 della tossina adoperata.

PRIMO GRUPPO.

Immunizzazione — Lesione nervosa — Inoculazione di "virus"

Esperienze preliminari (dirette, come si è detto, a determinare la virulenza della coltura adoperata e ad accertare l'avvenuta immunizzazione):

In quattro cavie del peso medio di 400 gm. già immunizzate con cmc. 0,10 di siero antidifterico iniettato 1, 2, 18, 24 h. prima, e in altre due dello stesso peso circa, non immunizzate, si inocula un' ansa di cultura viva di bacillo di Löffler in agar, che data da 10 giorni. Le prime quattro cavie sopravvivono, le altre due soccombono dopo 48-72 h. per infezione difterica, come dimostra la sezione necroscopica (infiltra-

zione edematosa sottocutanea, versamento pleurico, iperemia degli organi, in ispecie della milza e del fegato e delle capsule surrenali).

Le stesse inoculazioni si fanno poi in altre cavie testimoni contemporaneamente e parallelamente alle esperienze seguenti:

Serie I.

Esperienze in cui l'inoculazione del « virus difterico » è fatta nel lato paralizzato (ossia sottratto all'innervazione) subito dopo (infra l'ora) della lesione nervosa.

A. Lesione del cervello. — Le cavie operate al cervello, dopo 1-2 h., 18-24 h., dall'avvenuta immunizzazione, non tenendo conto di quelle morte subito dopo l'operazione per emorragia o per grave lesione dei centri nervosi e simili, furono sei, delle quali tre furono operate a destra e tre a sinistra: in quelle l'inoculazione del virus fu fatta nell'arto pelvico sinistro, in queste nel destro. Tutte sopravvissero.

Le cavie testimoni non immunizzate morirono dopo 48-72 h.

Tralascio per amor di brevità, dopo quanto ne ho detto di sopra, i dati riferibili ai particolari della scervellazione, ai fenomeni presentati dopo di essa, al peso, alla temperatura, ecc.

Queste esperienze furono eseguite a' 24 e 25 febbraio 1897, e le cavie furono tolte d'esperimento alla fine del marzo.

B. Lesione del midollo spinale. — Le cavie operate al midollo spinale (dopo 1-2 h., 18-24 h. dall'avvenuta immunizzazione) furono cinque, due di sezione completa, tre di emisezione, in modo che nel primo caso se ne ebbe la paraplegia, e nel secondo l'emiparesi o la paralisi più accentuata in un arto e meno nell'altro. Il risultato delle inoculazioni difteriche fu in tutte negativo, cioè le cavie sopravvissero. Stimo superfluo il ripetere le stesse avvertenze di sopra.

Queste esperienze furono eseguite a' 24 e 25 febbraio 1897, e le cavie furono tolte di osservazione alla fine del marzo.

Serie II.

Esperienze in cui l'inoculazione del « virus difterico » è fatta nel lato non paralizzato (ossia ad innervazione integra) subito dopo (infra l'ora) della lesione nervosa.

A. Lesione del cervello. — Le cavie operate al cervello (pure dopo 1-2 h., 18-24 h. dalla immunizzazione) furono cinque, di cui tre furono operate a destra e due a sinistra; in quelle l'inoculazione del virus fu fatta nell'arto pelvico destro, in queste nel sinistro. Le cavie sopravvissero tutte.

Anche queste esperienze furono eseguite il 24 e il 25 febbraio 1897, e le cavie furono tolte d'esperimento alla fine del marzo.

B. Lesione del midollo spinale. — Le cavie operate al midollo spinale (pure dopo 1–2 h., 18-24 h. dall' immunizzazione) furono cinque, due di sezione completa e tre di emisezione: in quelle l' inoculazione fu fatta sotto la cute del petto, in queste sotto quella della coscia non paralizzata.

Anche tutte queste cavie sopravvissero.

Queste esperienze vennero praticate il 24 e 25 febbraio 1897, e le cavie furono messe fuori osservazione alla fine del marzo.

Discuteremo in seguito il risultato negativo di questi esperimenti, intanto passiamo a riassumere quelli del

SECONDO GRUPPO.

Immunizzazione — lesione nervosa — inoculazione di « tossina ».

Esperienze preliminari. — L' immunizzazione fu praticata come nelle serie precedenti, e come in esse si adoperò sempre il controllo tanto dell'avvenuta immunizzazione quanto della virulenza della tossina. La dose della tossina iniettata, come si è detto sopra, era sempre proporzionale al peso della cavia.

Serie I.

Esperienze nelle quali l' inoculazione della « tossina difterica » è fatta nel lato paralizzato (ossia sottratto all' innervazione) subito dopo (infra l'ora) della lesione nervosa.

A. Lesione del cervello. — Le cavie operate al cervello (dopo 1-2 h., 18-24 h. dall' immunizzazione) furono in tutto otto, di cui cinque operate a destra e tre a sinistra: nelle prime l' inoculazione della tossina fu fatta nella coscia sinistra, nelle seconde in quella destra. Tutte sopravvissero.

Queste esperienze vennero eseguite il 25 e 26 agosto 1896 e il 14 e 15 maggio 1897; e le cavie vennero tenute in osservazione più di un mese.

B. Lesione del midollo spinale. — Le cavie operate al midollo spinale (dopo 1-2 h., 18-24 h. dall' immunizzazione) furono sette, di cui tre operate di sezione completa e quattro di emisezione. L'iniezione della tossina fu fatta sempre negli arti paralizzati.

Si ottenne come risultato che sopravvissero tutte, tranne di una,

operata di sezione completa 24 h., dopo della immunizzazione, e inoculata nella coscia destra; essa morì in quarta giornata, coi segni della intossicazione difterica.

Queste esperienze vennero fatte il 25 e 26 agosto 1896 e il 14 e 15 maggio 1897, e se ne sorvegliò l'esito per qualche mese.

SERIE II.

Esperienze nelle quali l'iniezione della « tossina difterica » è fatta nel lato non paralizzato (ossia ad innervazione integra) subito dopo (intra l'ora) della lesione nervosa.

A. Lesione del cervello. — Queste cavie (operate 1-2 h., 18-24 h., dopo dell' immunizzazione) furono sei, operate tre a destra e tre a sinistra, e l'inoculazione della tossina venne sempre fatta nel lato sano. Sopravvissero tutte sei.

Le esperienze furono praticate il giorno 25 e 26 agosto 1896 e il 14 e 15 maggio 1897, e se ne seguirono i risultati fino a qualche mese.

B. Lesione del midollo spinale. — Le cavie operate al midollo spinale (sempre come le precedenti 1-2 h., 18-24 h. dopo l'avvenuta immunizzazione) furono otto, delle quali cinque operate di emisezione sinistra e tre di sezione completa. Tanto nelle prime che nelle seconde la inoculazione della tossina difterica fu fatta negli arti sani, non paralizzati.

Si ebbe per risultato che sette sopravvissero, e una morì in quarta giornata coi segni della intossicazione difterica. Essa era stata operata di sezione completa 24 h. dopo della immunizzazione, ed inoculata colla tossina sotto la cute della spalla destra.

Le esperienze furono fatte il 25 e 26 agosto 1896 e il 14 e 15 maggio 1897, e fu seguito l'esito di esse fino a qualche mese dopo.

Le conclusioni che si ricavano dalle precedenti esperienze, tanto del primo che del secondo gruppo, sono le seguenti:

« 1. Se nelle cavie, immunizzate contro la difterite per mezzo del « siero antidifterico, si produce una lesione nei centri nervosi (cer- « vello e midollo spinale), l'immunizzazione contro il virus (cultura viva) « si conserva, tanto nel caso che l'inoculazione del virus si fa nell' arto « sano, quanto nel caso in cui si fa nel lato paralizzato (serie I^a e II^a del « primo gruppo); e tanto nel caso che la lesione dei centri nervosi av- « viene dopo 18-24 h. dall'iniezione del siero antidifterico, quanto nel « caso in cui avviene dopo 1-2 h.

« 2. Nelle cavie, ugualmente immunizzate, l'immunizzazione contro « la tossina si conserva, tranne in 2 sopra 29. (Serie I^a e II^a del

« secondo gruppo). Queste cavie furono ambedue operate di sezione « completa del midollo spinale dopo 24 h. dell'immunizzazione e ino- « culate colla tossina difterica una al lato sano (4ª della serie IIª B.) « e l'altra al lato paralizzato (3ª della serie Iª B) ».

Non tenendo per ora conto di queste due eccezioni, vediamo come dobbiamo interpretare questi risultati negativi, e specialmente mettendoli in raffronto con quelli ottenuti da Giuffré e Pollaci.

A prima vista le due conclusioni, e specialmente la prima, contradicono al 1° corollario, ricavato dai detti sperimentatori dalla Iª e IIª serie delle loro esperienze. Esso infatti è così formulato: « il colombo « prende l'infezione carbonchiosa se l'inoculazione di essa (cultura « viva) si fa in parti che non conservano i rapporti normali coi centri « dell'innervazione, e specialmente se sono lesi direttamente i centri « cerebrali o gli spinali ».

Identico risultato ebbe, come si è detto, il Lunghini nei colombi immunizzati contro il vibrione del Metchnikoff. Invece nelle nostre analoghe e quasi identiche esperienze si ebbe un risultato negativo: nelle nostre cavie l'inoculazione del virus non attecchì, anche quando essa venne fatta nelle parti paralizzate.

L'apparente contradizione cessa se si pone mente alle seguenti considerazioni. A parte la maggiore o minore differenza nel rapporto tra il grado dell'immunità e il grado della virulenza della cultura adoperata, per cui se tale differenza è minima si comprende più facilmente come una lesione nervosa possa sopprimere l'immunità, bisogna considerare la differenza notevole che c'è nel modo di agire delle due infezioni, la carbonchiosa e la difterica, e quindi ancora delle due immunità. L'una è uno dei tipi meglio accertati di vera e propria infezione, ritrovandosi sempre il bacillo nel sangue degli animali infetti, l'altra invece è un tipo ben diverso, rappresentando, più che una infezione, una vera e propria intossicazione, come già hanno dimostrato il Löffler, Roux e Yersin e tanti altri. Le cavie, quindi, essendo rese immuni contro la infezione difterica per mezzo del siero, ossia per mezzo di una sostanza chimica circolante nel sangue e negli umori dell'organismo, i bacilli difterici non possono produrre l'infezione, inoculati sia nelle parti sane, che in quelle snervate, poichè tanto nelle une che nelle altre incontrano le antitossine inoculate col siero, le quali impediscono la produzione delle tossine o le neutralizzano appena si producono: l'infezione, in altri termini, è distrutta nel sito stesso dell'inoculazione e l'animale resta immune. Nel fatto, dunque, non vi è contradizione tra il risultato delle esperienze di Giuffré e Pollaci e il mio; chè anzi questo indirettamente conferma quello, o per dir meglio, ne è una splendida

controprova, essendo benissimo comprensibile, anzi logico, che il sistema nervoso influisca nel deprimere o esaltare quella immunità direttamente legata alle funzioni della cellula, così detta *istogena* (come è quella dei colombi per il bacillo del carbonchio e per il vibrione di Metchnikoff) e non quelle dipendenti da sostanze chimiche vaccinali preformate e immesse direttamente nel torrente della circolazione.

Questa maniera di interpretare i fatti è confermata pure dalla seconda conclusione che si intende da sè dopo il già detto.

Intanto come si spiega che le due cavie segnate col N. 3, serie I^{a} B. e N. 4 serie II^{a} B, soccombettero alla intossicazione?

Per le esperienze di Roux dobbiamo ritenere che l'organismo animale non resta puramente passivo, come ritenevasi da Behring ed Ehrlich, quando gli si conferisce l'immunità colle iniezioni di siero antidifterico (o di altri analoghi): esso sotto l'azione del siero pare sia eccitato ad elaborare per proprio conto nuova sostanza antitossica, come, in molto maggiore proporzione, si ammette generalmente nel caso si tratti dell'immunità, detta *attiva*, provocata, cioè, colle tossine stesse batteriche, negli animali da cui si ottiene appunto il siero antidifterico (od altri analoghi). Il grado quindi dell'immunità *passiva* non è solo esclusivamente proporzionale alla dose delle antitossine contenute nel siero iniettato, ma anche a quell'altra, relativamente piccola, che fabbrica per proprio conto l'organismo. Evidentemente tale elaborazione è il prodotto dell'attività cellulare dei tessuti ed organi, di modo che, se noi sopprimiamo tale attività per mezzo della lesione nervosa (e a questa conclusione venne il Giuffrè nella seconda parte del citato lavoro), noi avremo anche soppresso quella partecipazione (provocata ma attiva) dell'organismo alla immunizzazione, e quindi può darsi che in tal caso riesca mortale una dose di tossina, che a parità di altre condizioni è innocua per un animale sano.

E si noti che soccombettero due delle cavie in cui la lesione nervosa (sezione del midollo dorso-lombare) si produceva 24 h. dopo che si era fatta l'iniezione immunizzante, cioè quando, è a credere, una certa quantità dell'antitossina inoculata si fosse già eliminata: per cui soppressa in tal momento anche quella partecipazione di buona parte dell'organismo si verificò la cessazione dell'immunità. E siccome altre sei cavie (oltre quelle operate al cervello) che si trovavano in quelle stesse condizioni, conservarono l'immunità, se ne deve inferire che in generale scarsissima è in questo caso la partecipazione dell'organismo alla immunizzazione, e ben limitata l'azione della lesione nervosa.

Istituto d'Igiene della R. Università di Palermo

SULLE DERMATOSI

nelle autointossicazioni e nelle intossicazioni batteriche sperimentali

RICERCHE

DEL

Dott. B. FRISCO

(Con una tavola)

La cute, sia per le molteplici ed importanti funzioni che compie a vantaggio dell'organismo, sia per i suoi intimi rapporti col mondo esterno, è esposta ad una quantità d'influenze morbigene (fisiche, chimiche, parassitarie) che possono derivare così dall'interno dell'organismo, come dall'esterno.

Ma, mentre lo studio delle cause *estrinseche* ha avuto in dermatologia un grande sviluppo, tanto che per molto tempo si è ritenuto che, salvo poche eccezioni, quasi tutte le affezioni cutanee fossero provocate da agenti esterni, di natura parassitaria o non; la conoscenza, invece, delle cause *intrinseche* è stata quasi completamente trascurata. Ed anche nei rari casi, in cui l'influenza morbigena era evidentemente derivata dall'interno dell'organismo, i dermatologi solo teoricamente ammettevano l'ipotesi che talune malattie della pelle dovessero nascere da un disordine o del sangue, o dei tessuti intimamente e anatomicamente considerati come cellule e fibre, o dei nervi o dei linfatici.

Tilbury Fox credeva perfino erronea l'ipotesi di ascrivere certe malattie della pelle ad una discrasia degli umori dell'organismo, credendola solo ammissibile nelle eruzioni dovute alle infezioni specifiche acute, alla sifilide ed alle espulsioni di medicinali, e riteneva d'altra parte che le alterazioni del sangue o degli umori potessero solo in molti casi, influenzare e modificare materialmente certe affezioni originatesi primitivamente sulla superficie cutanea.

Ma quando si pensi che nell'organismo animale stesso si formano tali e tanti veleni, sia fisiologicamente che patologicamente, la cui ritenzione da una parte ed eliminazione dall'altra sono capaci di provocare una serie di disturbi, dei quali oggi la clinica e la patologia sperimentale hanno di comune accordo rilevato la grande importanza (Bouchard,

Gautier ecc.), non credo che si possa più mettere in dubbio l'influenza diretta di tali veleni sulla produzione di svariate lesioni cutanee.

I detti veleni, infatti, sia che si formino nel tubo gastrointestinale per anormali fermentazioni o per l'uso di cibi avariati, sia che vengano elaborati nell'interno dei tessuti o del sangue, sia che rappresentino il prodotto dei batteri penetrati nell'organismo, debbono necessariamente far risentire la loro malefica azione o direttamente, o indirettamente, sulla cute, considerata e come tessuto e come organo emuntorio.

Ed invero le ricerche istopatologiche, recentemente publicate dal dott. Pollaci, [1] dimostrerebbero che la cute dei nefritici subisce delle alterazioni, dovute, con molta probabilità, oltre che alla iperattività funzionale, alla quale è costretta nelle alterazioni renali, benanco alla intossicazione che gli elementi anatomici di essa subiscono per l'alterata crasi sanguigna, prodotta dall'eccesso di acido urico circolante e che non può eliminarsi per la via dei reni.

Di modo che è da ritenere che un certo numero di disturbi cutanei siano prodotti da intossicazione autoctona dell'organismo e non mai da agenti esterni. A questo proposito possiamo dire che le osservazioni cliniche hanno portato un valido contributo, per quanto indiretto, in appoggio di questa ipotesi. Si sa infatti che un gran numero di sostanze metalliche provocano degli eritemi, dei fenomeni di urticaria e degli eczemi negli operai, che, per ragione di mestiere, sono costretti ad inalarne la polvere, e fra queste i preparati mercuriali tengono il primo posto; si sa come si possono avere degli eritemi in seguito all'ingestione di alimenti avariati e di bevande corrotte; in qualche caso è noto come si produce della porpora che sembra l'effetto di una alterazione del sangue e dei vasi, e si osserva sopratutto nell'uso dei balsamici, ed in special modo nell'uso del ioduro.

Il Bouchard, [2] ricordando a questo proposito le osservazioni cliniche di Hayem e di Feré, fa notare che veramente alcune alterazioni cutanee siano dovute a veleni dell'organismo stesso, e che la patogenesi di esse si spieghi o per la dilatazione vasomotoria riflessa, o per l'eliminazione di essi veleni attraverso la pelle, o per un'autointossicazione secondaria, specie nei disturbi dispeptici. In questi casi, infatti, basta l'uso dei disinfettanti intestinali per fare scomparire le manifestazioni cutanee.

Questo fatto verrebbe ancora più confermato da altre osservazioni

---

[1] Le ghiandole sudoripare nei nefritici. *Riforma medica*, N. 92, 1896.

[2] *Traité de pathologie générale.*

cliniche, di *erythema nodosum* e di urticaria, registrate da Westphalen, [1] e da altre di Neuman, [2] e di Siredey, [3] il quale ultimo avrebbe osservato un caso di eritema scarlatiniforme desquamativo, secondario ad una tipica intossicazione autoctona. E non è certamente di minore importanza il fatto che, nei fanciulli, la maggior parte delle malattie cutanee, sono la conseguenza di una dieta sconveniente, e del cattivo uso dei cibi avariati, la cui facile decomposizione nel tubo gastroenterico, dà luogo alla produzione di veleni, che, entrati nel circolo generale, sono in grado di provocare delle alterazioni cutanee. D'altro canto negli adulti alcune dermatosi si associano oltre che a disturbi dispeptici, anche ad alterazioni dei reni, del fegato o di qualche altro organo interno.

Che veramente la dermatosi che accompagna le malattie renali sia l'effetto di un'autointossicazione, lo dimostrano le ricerche del Quinquaud, [4] il quale ha visto, che nelle affezioni cutanee di origine renale, nelle dermatiti con grande esfoliazione e nell'eczema generalizzato, il siero di sangue è molto più tossico del normale.

Sino ad oggi però questa « *buona ipotesi* », come la chiama il Tommasoli, [5] riguardante il rapporto patogenetico delle dermatosi autotossiche, è rimasta allo stato di semplice ipotesi, confortata esclusivamente da molte prove cliniche, e si è ritenuta quasi impossibile una dimostrazione sperimentale di essa; tanto che lo stesso Tommasoli, [6] che è stato il primo a trasportare nel campo dermatologico, da più che un decennio, la teoria delle autointossicazioni, e seguita ad esserne, ora che la teoria ha fatta tanta strada, uno dei più convinti e dei più caldi fautori ritiene che « *nei tempi che corrono sarebbe una vera follìa il pretendere delle dimostrazioni e dei dati positivi da una teoria come quella delle autointossicazioni, e sarebbe follìa anche maggiore lasciarli sperare in un tempo relativamente breve* ».

Pur non di meno io ho creduto opportuno di tentare la prova sperimentale di una ipotesi tanto geniale, per mezzo di una serie di osservazioni che mi è stato dato di raccogliere in questo laboratorio di

---

1 *Petersburg. Med. Wochen.* 1890.

2 *Gazzetta degli ospedali*, pag. 303. 1892.

3 Note sur un cas d'érytéme scarlatiniforme desquamatif. *Bull. de la Société médic. des hôpit.* 1894.

4 Des variations de la toxicité du serum sanguin dans les affections cutanées. *Soc. de dermatologie et syph.* 1893.

5 Sul gruppo delle prurigo in genere e sulla prurigo temporanea in specie. Milano 1894.

6 Loc. cit.

giene, durante i due ultimi anni, nel corso di svariate esperienze sulla immunizzazione degli animali con tossine di diversa provenienza: osservazìoni che, io credo, non lasciano alcun dubbio sul rapporto patogenetico che esiste fra certi veleni che fisiologicamente o patologicamente contaminano l'organismo e la produzione di alcune dermatosi.

Come animali, che più facilmente si prestano a questo genere di ricerche, ho prescelto i conigli. Questi erano sottoposti, per lo scopo delle mie esperienze, ad intossicazione lenta mediante veleni svariati che, sino ad un certo punto, realizzavano certe condizioni dell'organismo animale, e che potrebbero essere così classificati:

Veleni batterici	veleni intracellulari (proteine di batteri virulenli)	
	» » (proteine di batteri attenuati)	
	veleni extracellulari (tossine batteriche solubili)	
Veleni da disturbato ricambio materiale.	per ingestione di alimenti avariati	mais avariato,
		infuso putrido di carne.
	per intossicazione addisoniana sperimentale.	

I. Animali inoculati con veleni batterici.

a) Veleni intracellulari (proteine di batteri virulenti).

Conigli n. 3. — Il primo di questi è stato inoculato nel peritoneo con quantità in principio non letali e poi gradatamente crescenti, di culture di tifo in agar di 24 ore a 37°, (emulsione acquosa) la cui dose letale minima era rappresentata da circa $^{1}/_{100}$ della cultura stessa, sino al punto di sopportare bene l' inoculazione di una intiera cultura.

Dopo qualche mese dall'ultima inoculazione, sulla pelle del dorso e della faccia cominciarono a cadere i peli ed al posto di essi si sostituirono delle croste grigiastre fortemente aderenti all'epidermide e che difficilmente si lasciavano staccare. In meno di quindici giorni quasi tutta la cute dell'animale era ricoperta da ammassi di croste, specialmente in corrispondenza delle orecchie, della faccia e degli arti, tanto che l'animale presentava un aspetto veramente mostruoso.

Allora, siccome le apparenze di tale lesione cutanea, potevano far sorgere il dubbio che potesse trattarsi di una malattia parassitaria della pelle, credetti opportuno fare un esame batteriologico e culturale delle croste suddette. Il reperto però è stato — così in questi, come in tutti gli altri animali qui appresso accennati — completamente negativo; difatti, non è stato possibile di riscontrare alcun germe specifico nel ma-

teriale in esame, e neppure alcuno dei soliti epifiti cutanei. Però si è potuto notare, all'esame microscopico, che quelle produzioni aventi apparenza di croste, erano formate da un ammasso di cellule epidermiche, aderenti le une alle altre, rappresentando probabilmente un effetto dell'anormale e graduale mortificazione dello strato più superficiale dell'epidermide.

Dallo studio istologico poi della pelle, così apparentemente alterata, e del sistema nervoso (periferico e centrale) potei notare:

1. Che il tratto di pelle sottostante alle dette formazioni simili a croste, presentavasi atrofico in tutti i suoi elementi, tanto che lo strato epidermico era quasi completamente scomparso, e gli strati sottostanti mostravano tutti i caratteri di un tessuto atrofizzato, involuto, dove i rami terminali dei vasi arteriosi erano quasi oppilati per un processo abbastanza progredito di endoarterite.

2. Che anche i nervi periferici erano visibilmente alterati, per un processo di nevrite periferica, provocata forse dal disturbo trofico generale; e le cellule nervose della corteccia cerebrale presentavano anch'esse delle alterazioni protoplasmatiche (atrofia varicosa, cromatolisi più o men progredita) visibili colla reazione nera di Golgi, e con quella di Nissl.

Gli altri due conigli furono inoculati pure con culture di tifo, ma con dosi minori del primo. Di essi uno, che ancora vive, presenta alterazioni simili a quelle descritte avanti, ma limitate esclusivamente alla pelle della faccia e delle orecchie: l'altro, morto dopo un mese del primo, presentava delle aree alopeciche disseminate a tutto il dorso, e delle croste simili alle precedenti, durissime, in modo che il tratto di pelle corrispondente mostravasi macroscopicamente ispessito e duro.

All'esame istologico di questi tratti di pelle si notava una manifesta proliferazione embrionale perighiandolare, oltre alle alterazioni avanti descritte.

Queste alterazioni prese nell'insieme si potrebbero rassomigliare a quelle descritte da Mibelli [1] nella ipercheratosi.

b) Veleni intracellulari (proteine di batteri attenuati).

Conigli n. 2. — Sono stati inoculati nel peritoneo con emulsione di cultura in agar di streptococco piogeno attenuato, che non determinava la morte degli animali, neanche se inoculato ad alte dosi. Essi sono sopravvisuti: però, dopo qualche settimana perdettero quasi tutti i peli.

---

[1] *Giornale italiano delle malattie veneree*, XXVIII, 3.

Contemporraneamente si ebbe a notare una progressiva diminuzione di peso.

Cavie n. 2. — Sono state inoculate come sopra, con culture di stafilococco albo attenuato al punto che, neppure in altissime dosi, produceva la morte degli animali.

Questi animali dopo venti giorni circa dall'inoculazione presentavano alopecia diffusa.

L'esame istologico della pelle di uno di essi, morto dopo due mesi, permetteva di osservare una diffusa alterazione vasale, avente tutti i caratteri dell'endoarterite dei vasi cutanei. Inoltre l'epidermide era assottigliata, e nello spessore del derma si notava qualche piccolo ammasso di granuli grassi, lo che dimostrava evidentemente il grado di involuzione del tessuto.

c) Veleni extracellulari (tossine batteriche solubili).

Conigli n. 3. — Sono stati immunizzati con dosi crescenti di tossina difterica per la via sottocutanea. Durante il tempo dell'immunizzazione presentarono alopecia temporanea parziale o estesa a quasi tutto il dorso. La porzione di pelle rimasta così denudata di peli era diventata secca e scabrosa, tanto che l'epidermide si desquamava in piccole lamelle furfuracee, secche. Queste alterazioni potevano rassomigliarsi a quelle che si hanno nella *xerodermia.* Questa secchezza della pelle, come fa osservare Vidal,[1] è l'effetto immediato del disturbo nutritivo degli elementi anatomici della pelle, precisamente come succede negli individui cachettici. E la desquamazione, d'altro canto, deve, secondo il mio modo di vedere, considerarsi come un sintomo dell'azione diretta della causa patogena (in questo caso il disturbo nutritivo) sullo strato germinativo dell'epidermide.

II. Animali sottoposti a disturbo del ricambio materiale.

a) Per ingestione di alimenti avariati.

Conigli n. 8. — Questi furono inoculati per la via della bocca o per la via sottocutanea, alcuni con infuso putrido di mais, altri con infuso putrido di carne, previa sterilizzazione di detti infusi al filtro Chamberland.[2] In alcuni di essi si ebbe alopecia quasi totale, in altri

---

[1] *Traité descriptif des maladies de la peau,* 1889.

[2] N. B. Per le modalità dell'esperimento vedi mio lavoro precedente: *Azione degl' infusi putridi sull'organismo animale.* Questi Annali, vol. V, 1895.

la comparsa di bolle e di croste, di apparenza eczematosa, limitate o alla pelle della faccia, o alle sole palpebre d'ambo gli occhi.

L'esame istologico poi della pelle, oltre alle alterazioni descritte avanti, mostrava dei sollevamenti in corrispondenza delle cellule spinose, in modo che l'epidermide restava come distaccata dallo strato sottostante, formando con molta probabilità quelle bolle che erano visibili macroscopicamente. E siccome le dette bolle avevano la loro sede anatomica quasi immediatamente al disopra dello strato papillare, per ciò è da ritenere che l'alterazione vasale abbia influito sulla formazione di esse. Una volta poi che le sudette bolle per i traumi esterni si rompevano, ne seguiva la formazione o delle piccole ulcerazioni, o delle croste, in modo da mentire una serie di processi morbosi differenti fra loro.

b) Per intossicazione addisoniana sperimentale.

Conigli n. 6. — Questi animali erano stati privati delle capsule surrenali. Alcuni dopo parecchi giorni della decapsulazione presentarono alopecia totale e permanente, altri delle vere croste eczematose estese a quasi tutto il dorso, altri infine, oltre alle croste, delle ulcerazioni di aspetto fungoso, alla faccia interna degli arti posteriori, lungo il decorso dello sciatico, i cui rami furono riscontrati lesi.

All'esame istologico, quei tratti di pelle, dove si notavano le sudette fungosità, presentavano tutti i caratteri delle granulazioni infiammatorie. In questi animali come anche in quelli inoculati con infuso putrido di mais avariato, le alterazioni nervose erano estese anche al sistema nervoso centrale, come ho accennato altrove. [1]

Prima di esporre, secondo la mia opinione, il meccanismo di produzione delle suddette toxidermie, credo opportuno di riassumere brevemente le varie alterazioni riscontrate nei miei animali di esperimento.

---

1 Sulle alterazioni del sistema nervoso nell'avvelenamento cronico per mais avariato. *Bollettino della Società di Igiene di Palermo*, 1896.

N. B. — Stimo non inutile di ripetere che negli animali inoculati, con tossine di date specie batteriche o con infusi putridi, solo una parte presentarono le alterazioni sopra descritte, poichè mentre alcuni morivano prima ancora che tali lesioni fossero manifeste, altri s' immunizzavano restando perfettamente integri. Questo fatto, mentre dimostra il modo svariato di reagire dei diversi organismi al trattamento *vaccinale* con tossine batteriche, prova come vi siano organismi *non vaccinabili* in tal modo, probabilmente perchè incapaci ad elaborare antitossina in quantità o in qualità adatta, per reagire completamente contro l' influenza tossica.

I. Negli animali inoculati con puri veleni batterici le alterazioni cutanee più importanti furono:

a) Lo sviluppo di squame simili apparentemente a croste bianco-grigiastre, fortemente aderenti alla pelle sottostante, formate di cellule epidermiche e prodottesi per un'anormale corneificazione delle stesse; le quali produzioni, per il modo d'insorgere, per lo sviluppo successivo e per la sede anatomica, rappresentano una ipercheratosi, che forse potrebbe rassomigliarsi ad un processo psoriasico [1]. Inoltre nei punti in cui le dette pseudocroste avevano raggiunto il maggiore sviluppo, i tratti di pelle sottostante presentavano i caratteri di un tessuto involuto, atrofico e duro anche alla semplice palpazione.

b) Una diffusa alterazione dei nervi periferici destinati alla motilità ed al trofismo degli arti, non che talune alterazioni nelle cellule della corteccia cerebrale.

c) La comparsa di *aree alopeciche*, più o meno estese, alla superficie del corpo dell'animale di esperimento, con tendenza a diffondersi, in qualche caso a tutto il dorso del medesimo, che duravano, quasi costantemente in alcuni, sino a che non veniva rimossa la causa determinante, in altri persistevano anche dopo cessata l'azione dell'agente patogeno.

d) Nei tratti di pelle rimasti denudati di peli, la formazione squamosa di piccole lamelle furfuracee, secche, che potevano rassomigliarsi a quelle che si hanno nella *xerodermia*.

II. Negli animali poi sottoposti a disturbo diretto del ricambio materiale, o colla somministrazione per vie diverse d'infusi di alimenti avariati, oppure sia col disturbo funzionale, che colla distruzione di un organo interno importante per l'economia animale, (distruzione delle capsule surrenali nel caso presente) le alterazioni più manifeste che si notarono sono:

a) La comparsa di *alopecia* più o meno generalizzata e permanente.

b) La formazione di bolle e di croste di apparenza eczematosa, in vari punti del corpo dell'animale, e specie alla faccia interna degli arti posteriori, lungo il decorso dello sciatico, i cui rami furono riscontrati pure lesi.

c) Negli animali così trattati le alterazioni della corteccia dovute

---

1 Anche il prof. TOMMASOLI, al quale sento il dovere di porgere i miei sinceri ringraziamenti, dopo avere osservato accuratamente alcuni degli animali in esperimento che presentavano tali lesioni, ha creduto di poterle rassomigliare clinicamente ad un processo psoriasico.

al disturbo nutritivo, nonchè quelle dei nervi periferici, erano molto più estese che non nella prima serie di animali (vedi il mio lavoro sul mais avariato).

Di modo che, in ordine alle alterazioni riscontrate in queste mie ricerche sperimentali, si può concludere:

1. « Le tossine batteriche (solubili o non) che eventualmente pos-« sono contaminare l'organismo, quando vengono in esso introdotte « (per la via peritoneale o sottocutanea), sono capaci di dar luogo a « speciali alterazioni cutanee, dopo aver provocato, in un tempo più o « meno lungo, un disturbo nutritivo dell'organismo animale.

2. « La qualità e la gravità di tali alterazioni varia colla qualità « e colla quantità delle tossine batteriche adoperate, e per una stessa « tossina quanto più a lungo è durata la intossicazione, tanto maggiori « e più estese sono le alterazioni che si producono.

3. « Le alterazioni suddette possono essere determinate non solo « dalle tossine batteriche che accidentalmente vengono a contaminare « l'organismo, ma anche da taluni prodotti di fermentazione putrida « dell'intestino che si formano o per ingestione di alimenti avariati o « per putrefazione degli alimenti ingeriti; nonchè dai prodotti tossici « di disassimilazione per disturbo trofico generale, formatisi nell'interno « dei tessuti.

4. « Tali alterazioni si possono rassomigliare ad alcune che la « clinica ha permesso di studiare sull'uomo, e che vanno sotto il nome « di alopecia, circoscritta o diffusa, di xerodermia, di eczema, di pso-« riasi.

5. « Non tutti gli animali di esperimento, sottoposti allo stesso « trattamento, presentavano tali alterazioni cutanee, poichè mentre al-« cuni s'immunizzavano, mostrandosi sani, altri, o morivano, ovvero « dopo qualche mese, ovvero dopo parecchi mesi dall'ultima inocula-« zione, presentavano le dette alterazioni ».

Considerazioni e conclusioni generali.

Tali essendo i risultati delle mie esperienze, sorge la domanda: in che modo i veleni elaborati nell'organismo allo stato fisiologico o patologico, o quelli che accidentalmente vengono ad inquinarlo dal di-fuori, possono provocare le suddette alterazioni cutanee?

Certamente per potere stabilire colla maggiore precisione possibile questo rapporto etiologico, bisogna ricordare le alterazioni anatomiche riscontrate tanto nella pelle, che nel sistema nervoso centrale e peri-

ferico. Ora i fenomeni di endoarterite e di nevrite periferica ci indicano che i veleni suddetti sono capaci, per la via del circolo generale, di provocare uno stato infiammatorio, irritativo, tanto nei vasi della cute che nei nervi periferici che presiedono, non solo alla motilità e sensibilità dell'animale, ma anche al trofismo delle parti da essi innervate, compresa la cute e i vasi stessi della cute. Siccome poi la cute è un organo destinato anche a liberare l'organismo da molte sostanze estranee che l'inquinano, per ciò stesso deve necessariamente subire l'azione tossica dei veleni che l'attraversano: prima di tutto i singoli elementi anatomici di essa vengono intossicati e disturbati nella loro attività fisiologica, perchè ricevono un nutrimento incompatibile colla loro vita; in secondo luogo si ha una irritazione chimica e meccanica determinata negli elementi anatomici dal passaggio di dette sostanze.

In quanto alle alterazioni del sistema nervoso centrale poi bisogna ricordare, come ho dimostrato in altri lavori precedenti, [1] che erano spiccate le note alterazioni protoplasmatiche di *atrofia varicosa* e di *cromatolisi*, delle cellule della corteccia cerebrale, specie in quegli animali che erano stati o inoculati per diverse vie con infuso di mais avariato, o che erano stati sotto l'influenza dell'intossicazione addisoniana sperimentale e che avevano presentato delle abbondanti croste eczematose sulla pelle.

D'altra parte poi recentissimamente è stato dimostrato dal Cristiani [2] che, nelle autointossicazioni di origine intestinale, i prodotti tossici alterano direttamente e primitivamente le cellule e le fibre nervose cerebrali e spinali, in cui determinano processi degenerativi, i quali costituiscono il substrato anatomico dei disturbi nervosi da autointossicazione di origine intestinale.

Ora i prolungamenti protoplasmatici delle cellule nervose rappresentano il veicolo, per mezzo del quale si compie la nutrizione del corpo cellulare (Golgi, Monti, ed altri); di modo che quando sono alterati nella loro struttura e nella loro funzione, anche la cellula nervosa corrispondente viene ad essere disturbata nella sua nutrizione e nel modo di funzionare. In questo modo alteratasi la funzione di tutte le cellule nervose, e per ciò di tutto il sistema nervoso centrale, si ha un disturbo nel ri-

---

[1] Alterazioni del sistema nervoso centrale nell'avvelenamento cronico per mais avariato ecc. *loc. cit.*

Idem. — Le capsule surrenali ecc. *loc. cit.*

[2] Le fine alterazioni del sistema nervoso centrale nelle autointossicazioni acute sperimentali di origine intestinale. *La Clinica moderna.* N. 2, 1897.

cambio materiale generale di tutto l'organismo, come ha dimostrato Belmondo,[1] e un disturbo nella funzione dei nervi periferici che presiedono al trofismo delle parti innervate.

La cute quindi risentirà tanto gli effetti della intossicazione diretta per i veleni circolanti nel sangue, quanto quelli dovuti all'irritazione meccanica durante il momento della loro eliminazione attraverso ad essa, quanto anche gli effetti del disturbato funzionamento e trofismo del sistema nervoso centrale e periferico. E il disturbo funzionale dei nervi periferici in ispecie porta come conseguenza immediata il disturb trofico della pelle (Lancereaux [2]), la quale comincia coll'ispessirsi e mortificarsi, e in seguito poi si desquama; ovvero gli elementi epidermici mortificati restano attaccati fra loro formando delle squame di forma e di apparenza svariata, che mentiscono questa o quell'altra alterazione cutanea.

In un mio recente lavoro [3] io aveva già accennato all'influenza delle alterazioni nervose periferiche sulla comparsa di alterazioni cutanee corrispondenti al tratto di cute innervata dai nervi lesi.

Questo mio modo di vedere, sul meccanismo di effettuazione delle alterazioni cutanee da cause interne, (autointossicazioni e intossicazioni batteriche) basato sui risultati sperimentali e sulle alterazioni anatomo-istologiche osservate, è stato, per ciò che riguarda la parte della *irritazione* e dell'*azione flogogena*, ampiamente discusso ed ammesso dal Tommasoli,[4] il quale ha potuto, con scrupolose e numerosissime osservazioni cliniche, mettere innanzi e confermare queste nuove vedute sulla produzione delle *cheratodermiti* da cause interne.

Il Tommasoli infatti sin dal 1886 in varie pubblicazioni [5] aveva espresso il suo pensiero in proposito, ed egli stesso, che, dopo il Lassar, aveva riprodotto nei conigli mercè innesto di sostanza psoriotica, una manifestazione cutanea psoriforme, dovette abjurare e credere all'idea di una sostanza patogena *bio-chimica*, colla quale potevano essere spiegati anche i casi di *pseudotrasmissione*.

Pur ammettendo però che i veleni dell'organismo spieghino una certa

---

[1] Rapporti tra le funzioni cerebrali ed il ricambio. *Rivista sperimentale di freniatria*, fas. IV, 1896.

[2] Des trophonévroses des extrémités ou acrotrophonévroses — Trophonévrose nécrosique ou gangrène nevropatique — *Sem. Med.* n. 33, p. 261, 1894.

[3] Loc. cit. *Le capsule surrenali nei loro rapporti* ecc.

[4] Ueber autotoxische Keratodermiten: *Hamburg und Leipzig*. 1893.

[5] Ricerche e considerazioni sopra un caso di pemfigo cronico. Siena 1885.
Sulla natura dell'erpes zoster. Napoli 1886.
Articolo sul pemfigo. *Enciclopedia medica italiana*. Milano, Vallardi.

influenza sulla produzione di alcune malattie cutanee, si potrebbe supporre che tali veleni agiscano solo per diminuire la resistenza della pelle, predisporla e renderla più facilmente attaccabile dagli agenti patogeni del mondo esterno, i quali sarebbero così in grado di moltiplicarvisi dando luogo a questa o a quell'altra forma morbosa cutanea.

Ma prima di tutto bisogna notare, in risposta a tale obiezione, che nei casi da me osservati l'esame microscopico e culturale delle produzioni patologiche non solo non mi ha permesso di scorgervi dei germi patogeni della pelle, che avessero una lontana somiglianza con quelli finora descritti, ma nemmeno di rintracciarvi colonie dei comuni batteri banali che ordinariamente si possono trovare sulla pelle. Inoltre coll' esame istologico non ho riscontrato alcuna forma parassitaria nello spessore del tessuto proprio della pelle.

E se tale obiezione è ammissibile per alcune forme di dermatosi ritenute universalmente come l'effetto di agenti patogeni specifici, non si può a priori estendere a tutte le malattie cutanee, specialmente a quelle, la di cui causa prima o è completamente sconosciuta, o è incompletamente studiata; tanto più quando i risultati degli studi sperimentali, fatti da diversi ricercatori, sono in contradizione manifesta (Lang, Eklund, Tommasoli, Ducrey, Schutz, Tortellier ecc.).

Si sa infatti che la causa della psoriasi è stata variamente interpretata; mentre per alcuni è un'affezione di origine puramente nervosa, per altri invece è una dermatosi parassitaria.

Il Lang [1] pel primo ritenne che fosse di natura parassitaria, e credette di trovare nelle squame della psoriasi un fungo, la cui presenza sarebbe costante. La stessa idea fu sostenuta da Eklund [2], da Wolff, [3] da Lassar, [4] da Beissel, [5] da Tommasoli [6] e da Mapother; [7] ma in questi ultimi anni la teoria parassitaria della psoriasi è stata completamente demolita.

E infatti lo stesso Tommasoli [8] sin dal 1887, appena un anno dopo la

---

[1] Versuch einer Beurtheillung der Schuppenflechte nach ihren klinischen Charakteren. *Vierteljahresschrift für Dermatol. und Syphilis X.* p. 433-1878.

[2] Contribution à l'étude du « Lepòcolla repens » le Champignon élémentaire du psoriasis. *Annales de dermatol. IV.* 1883.

[3] Zur Aetiologie der Psoriasis. *Vierteljahresschrift für Dermatol. VI.* 33. 1883.

[4] *Berlin Klin. Wochens.* N. 47, 1885.

[5] *Monatsh. für Prakt, Derm.* N. 9, 1886.

[6] *Gazzetta degli ospedali.* N. 43-44, 1886.

[7] The parasitic nature of psoriasis; its treatment by mercury. *Britisch med. journal.* I. p. 110, 1891.

[8] Relazione di una visita alla scuola dermosifilopatica viennese. Bologna 1897.

sua pubblicazione sulla teoria parassitaria della psoriasi, non parteggiò più per l'idea di un parassita qualsiasi, poichè dalle sue numerose ponderate osservazioni, fatte tanto alla scuola dermosifilopatica viennese, quanto anche in Italia, aveva potuto convincersi che causa di tale forma morbosa, piuttosto che il parassita di Lang, doveva essere una sostanza patogena *bio-chimica*, colla quale « *senza sforzo*, come egli dice, *possono essere spiegati e i casi di pseudo-trasmissione sperimentale, e i casi in cui l'ereditarietà pare imporsi* ».

Queste sue idee l'autore l'ha poi discusse e confermate in altri lavori successivi [1] sull'ittiosi, sulla psoriasi in ispecie, e particolarmente in quello sulle cheratodermiti autotossiche nel quale, oltre al meccanismo di produzione delle cheratodermiti in genere, è trattato quello della psoriasi in ispecie.

D'altrà parte Ducrey, [2] dopo aver fatto una lunga serie di esperienze sull'uomo e sugli animali, seguendo la via epidermica, endermica, ipodermica, peritoneale e intratracheale, ha visto che in nessuno, sia degli uomini prestatisi, sia degli animali di esperimento, si è sviluppato un accenno di dermatosi, che potesse lontanamente rassomigliarsi alla psoriasi, Per cui egli concludeva che la psoriasi non è una malattia contagiosa, e che le forme parassitarie riscontrate dai precedenti autori non possono considerarsi come la causa vera di questa peculiare dermopatia.

La psoriasi dunque cominciò a considerarsi come l'effetto di un disturbo progressivo della nutrizione e i recenti studi del Bonneau, [3] dello Schutz, [4] e ultimamente del Tortellier, [5] sono venuti alle stesse conclusioni dei precedenti autori.

Dai risultati delle mie ricerche sperimentali, intanto, emerge chiaro il rapporto che esiste fra alcune dermatosi e i veleni che sono elaborati nell'organismo stesso, o che eventualmente vengono dall'esterno ad inquinarlo. E credo che tutte quelle alterazioni cutanèe, in cui tale rapporto clinico è evidente si possano serenamente considerare come il

---

[1] Sur l'histopathologie et la pathogenése de l'ichthyose. *Annales de dermatologie et de syphiligraphie*. N. 5-6, 1893.

[2] Sulla voluta contagiosità della psoriasi. Ricerche sperimentali. *Atti del XII Congresso medico di Pavia*. 1887.

[3] Contrib. a l'étude du psoriasis et de son traitement. *These de Bordeaux*. 1892.

[4] Beiträge zur Pathologie der Psoriasis. *Arch. für Dermatol. XXIV*, pagina 739, 1892.

[5] Contribution à l'étude de l'étiologie du psoriasis. *Thèse de Paris*. 1894.

risultato di un'intossicazione autoctona avvenuta nel modo da me descritto.

Però non bisogna ritenere che a provocare queste dermatosi autotossiche possano concorrere solo i veleni che si formano nel tubo gastroenterico per la putrefazione degli alimenti ingeriti, e per la ingestione di alimenti avariati, perchè anche quando altri organi destinati all'economia animale, vengono disturbati nella loro funzione o lesi nella loro struttura, si formano dei veleni capaci di ledere l'integrità dell'organismo, e perchè inoltre taluni veleni batterici, che nel corso delle infezioni, vengono a trovarsi nell'interno dei tessuti, possono, eliminandosi per la pelle, determinarvi delle alterazioni.

Dall'insieme delle mie osservazioni e considerazioni, mi credo autorizzato a ricavare le seguenti conclusioni generali:

« 1. Esiste veramente un rapporto patogenetico fra alcune dermatosi e i veleni che fisiologicamente o patologicamente si formano nell'organismo animale.

« 2. Tale rapporto esiste non solo per i veleni che si possono formare nel tubo gastro-enterico, ma anche per quelli che si formano nell'interno dei tessuti, e per certi veleni batterici, che, nelle malattie infettive, possono eventualmente contaminare l'organismo.

« 3. Non tutti gl'individui, anche della medesima specie (conigli), reagiscono egualmente all'azione lenta, frazionata dei detti veleni, ma alcuni s'immunizzano, altri soccombono più o meno presto, ed altri infine, dopo un tempo piuttosto lungo, presentano tipiche lesioni cutanee.

» 4. Le toxidermie, secondo le alterazioni anatomiche riscontrate nella pelle e nel sistema nervoso centrale e periferico, debbono considerarsi come l'espressione tanto del disturbo trofico generale, quanto del disturbo trofico locale della pelle stessa. »

SPIEGAZIONE DELLA TAVOLA I.

I disegni furono eseguiti senza prisma.

Fig. 1ª — Sezione trasversa di un frammento del nervo sciatico, lungo il decorso del quale si osservano delle croste eczematose e delle fungosità:

a) fibre nervose a scarso rivestimento mielinico;
b) proliferazione connettivale giovane;
c) ispessimento del connettivo interfascicolare o endonervio.

Fig. 2ª — Sezione di pelle in un punto in cui c'erano alcune pseudo-croste, e si palpava un indurimento connettivale:

a) vasi arteriosi sclerosati in proliferazione perivasale;

b) derma ispessito;

c) epidermide atrofica e assottigliata.

Fig. 3ª — Sezione di pelle in un altro punto, pure indurito e con squame:

a) ispessimento atrofico connettivale del derma con scomparsa quasi completa dello strato papillare;

b) cellule epidermiche corneificate che hanno perduto la loro forma naturale.

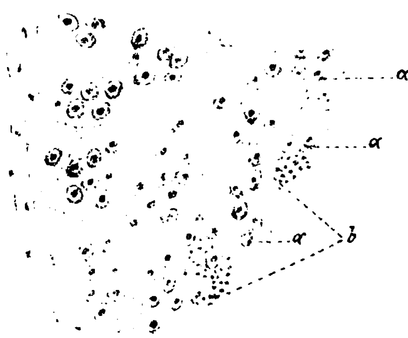
Fig. 4ª — Sezione di pelle in un punto in cui si notano come delle vescicole con arrossamento e delle croste:

a) ispessimento del tessuto corneo;

b) infiltrazione leucocitica del derma;

c) spazi chiari tra la sclerosi incipiente del derma e la retrazione dello strato delle papille.









A. Serino-Napoli

TITOLI DELLE MEMORIE DEL FASCICOLO I

da ritagliarsi per le schede dei cataloghi per autori e per materie

---

PEREZ G. **616.42**

Del modo di comportarsi del sistema ganglionare linfatico rispetto ai microrganismi. Parte II: I gangli linfatici nelle infezioni.

Roma, *Ann. d'Igiene sperimentale*. Vol. VIII, (nuova serie) fasc. I, p. 1-103 **1898**

CAPPELLETTI Ettore e VIVALDI Michelangelo **616.01**

Lo streptococcus equi. Ricerche sperimentali.

Roma, *Ann. d'Igiene sperimentale*. Vol. VIII, (nuova serie) fasc. I, p. 104-118 **1898**

CONCETTI Luigi e MEMMO Giovanni **616.931**

Sulla tossicità del bacillo di Loeffler in rapporto alla sua morfologia.

Roma, *Ann. d'Igiene sperimentale*. Vol. VIII, (nuova serie) fasc. I, p. 119-144 **1898**

PUPPO E. e OTTONI V. **616.077**

Sull'agglutinazione come mezzo diagnostico del bacillo tifico.

Roma, *Ann. d'Igiene sperimentale*. Vol. VIII, (nuova serie) fasc. I, p. 145-154 **1898**

PALERMO N. **616.01**

Influenza delle lesioni dei centri nervosi sulla immunità passiva. Ricerche sperimentali.

Roma, *Ann. d'Igiene sperimentale*. Vol. VIII, (nuova serie) fasc. I, p. 155-163 **1898**

FRISCO B. **616.5**

Sulle dermatosi nelle autointossicazioni e nelle intossicazioni batteriche sperimentali. Ricerche.

Roma, *Ann. d'Igiene sperimentale*. Vol. VIII, (nuova serie) fasc. I, p. 164-178 **1898**

PEREZ G. **616.42**

Del modo di comportarsi del sistema ganglionare linfatico rispetto ai microrganismi. Parte II: I gangli linfatici nelle infezioni.

Roma, *Ann. d'Igiene sperimentale*. Vol. VIII, (nuova serie) fasc. I, p. 1-103 **1898**

CAPPELLETTI Ettore e VIVALDI Michelangelo **616.01**

Lo streptococcus equi. Ricerche sperimentali.

Roma, *Ann. d'Igiene sperimentale*. Vol. VIII, (nuova serie) fasc. I, p. 104-118 **1898**

CONCETTI Luigi e MEMMO Giovanni **616.931**

Sulla tossicità del bacillo di Loeffler in rapporto alla sua morfologia.

Roma, *Ann. d'Igiene sperimentale*. Vol. VIII, (nuova serie) fasc. I, p. 119-144 **1898**

PUPPO E. e OTTONI V. **616.077**

Sull'agglutinazione come mezzo diagnostico del bacillo tifico.

Roma, *Ann. d'Igiene sperimentale*. Vol. VIII, (nuova serie) fasc. I, p. 145-154 **1898**

PALERMO N. **616.01**

Influenza delle lesioni dei centri nervosi sulla immunità passiva. Ricerche sperimentali.

Roma, *Ann. d'Igiene sperimentale*. Vol. VIII, (nuova serie) fasc. I, p. 155-163 **1898**

FRISCO B. **616.5**

Sulle dermatosi nelle autointossicazioni e nelle intossicazioni batteriche sperimentali. Ricerche.

Roma, *Ann. d'Igiene sperimentale*. Vol. VIII, (nuova serie) fasc. I, p. 164-178 **1898**

SULLE CONDIZIONI IGIENICHE

DEL CIMITERO COMUNALE DI ROMA AL CAMPO VERANO

RICERCHE

DEL

Dott. SAVERIO SANTORI

Batteriologo municipale.

Nel rinnovamento igienico che in questa seconda metà del secolo si è operato nell'edilizia e in tutte le altre manifestazioni della vita civile, una delle questioni che maggiormente ha appassionato tecnici e profani è stata quella dei cimiteri e del seppellimento dei cadaveri. Le varie fasi alle quali è andato soggetto il modo con cui i cadaveri venivano distrutti ci danno, possiamo dire, la storia delle conoscenze igieniche dei popoli nelle varie epoche, nonchè della loro vita civile e religiosa.

L'abbandono dei cadaveri nelle foreste e nelle caverne, la cremazione per mezzo di vasti roghi, l'inumazione al di fuori delle città in giardini ed in campi allietati da fiori e da alberi odorosi, ed il seppellimento nell'interno delle chiese, e in grandi fosse dette carnarie, formano i sistemi principali coi quali nei vari tempi si è cercato di ottenere la distruzione dei cadaveri.

Tralasciando come completamente inadatti, o per dir meglio dannosi, tutti gli altri sistemi, restano oggi la cremazione e l'inumazione nei cimiteri a contendersi il campo. Certo che, dal punto di vista strettamente igienico, è difficile non riconoscere i vantaggi grandissimi inerenti al processo della cremazione; fino ad oggi però, anche non volendo tener conto della ripugnanza che molti provano nell'abbandonare alle fiamme i resti dei loro cari, la grave spesa necessaria per una cremazione applicata su vasta scala, rende preferibile il sistema dell'inumazione. E' a questo perciò che quasi esclusivamente si sono rivolte le cure e le cautele, alle volte forse eccessive, dei nostri legislatori.

Le conoscenze odierne, specialmente in riguardo alla chimica organica ed alla biologia dei microrganismi, ci permettono di farci una idea abbastanza esatta di ciò che avviene in un cadavere dal giorno in cui viene inumato fino alla sua mineralizzazione completa. Due sono i processi principali che un cadavere, od una sostanza qualunque putrescibile, può subire nei vari periodi della sua decomposizione: il processo della decomposizione semplice senza prodotti di cattivo odore, seguito dalla nitrificazione, ed il processo della putrefazione propriamente detta.

La decomposizione semplice seguita dalla nitrificazione è, nel suo complesso, una vera e propria forma di ossidazione, per la quale i cadaveri abbandonati sotto terra, per mezzo di una serie di cambiamenti fisici e chimici, vengono decomposti, digeriti, purificati, suddivisi all' infinito e le loro molecole rese libere, unendosi ad altre molecole, formano combinazioni novelle, prendono parte a nuove creazioni, continuando in questo modo la circolazione della vita. I prodotti ultimi fortemente ossigenati che nascono da queste combinazioni sono in particolar modo l'acido carbonico, l'acqua, l'acido solforico e l'acido nitrico

Ad ottenere questo risultato agiscono specialmente i caratteri fisici e chimici del terreno e la maggiore o minore quantità di aria che può circolare in esso.

L'altro processo che può subire un cadavere è quello della putrefazione propriamente detta, che si verifica quando i caratteri del terreno o dell'aria non sono quelli richiesti, o quando la quantità delle sostanze organiche è eccessiva in proporzione della terra che le circonda. In questo caso la sostanza putrescibile, invece di nitrificarsi e dar luogo ai prodotti ossigenati suddetti, forma dei composti contenenti poco o punto ossigeno, come l'idrogeno solforato, l'ammoniaca, la trimetilammina, ecc. che insieme a molti altri prodotti, non ancora ben conosciuti, sono la causa del cattivo odore di tutte le sostanze in putrefazione.

È evidente quanto, dal punto di vista dell' igiene, il processo della nitrificazione sia molto preferibile a quello della putrefazione. Però nè la scelta più accurata del terreno, nè l'esecuzione di tutte le altre norme dettate dall' igiene sono sufficienti a farci raggiungere questo scopo, bastando a porvi ostacolo solo il fatto della impossibilità di porre tutta la sostanza decomponibile in intimo contatto con una grande quantità di terreno. La decomposizione quindi dei cadaveri, almeno nei primi tempi, quando cioè possono maggiormente riuscire dannosi, si avvera nei cimiteri quasi soltanto per mezzo della putrefazione; e solo nella sua ultima fase possono ad essa tener dietro i processi della nitrificazione.

Ammesso dunque questo fatto, tutto lo sforzo degli igienisti si è rivolto ad abbreviare più che sia possibile il primo periodo, e ad evitare che la decomposizione putrida di una così grande quantità di sostanze organiche possa arrecare danni all' uomo, inquinandone l' ambiente esterno. Un inquinamento siffatto potrebbe essere prodotto in vario modo e specialmente per le due vie principali dell'aria e dell'acqua. I gas putridi che abbiamo nominato, insieme ad altri eventuali gas tossici,uscendo fuori dal terreno si mescolano all'aria e con essa penetrando nelle abitazioni, potrebbero produrre nell'uomo fenomeni d'intossicazione. La stessa aria poi proveniente dal terreno potrebbe asportarne i germi e diffondere nell'aria esterna le più svariate malattie.

Dell' inquinamento dell'ambiente esterno viene poi, e forse più a ragione, incolpata l'acqua che scorre nelle vicinanze, o al disotto dello strato di seppellimento dei cadaveri. Essa dovrebbe raccogliere microrganismi infettivi e sostanze tossiche, le quali in seguito, se tale acqua comunica con quella dei pozzi della città, verrebbero in questi largamente versate.

Per appurare quanto in tutti questi fatti possa esservi di vero, e quali siano le condizioni del cimitero comunale di Roma al campo Verano in rapporto alla sua funzionalità, all' inquinamento che la putrefazione dei cadaveri potrebbe arrecare all'ambiente esterno ed ai pericoli che da ciò potrebbero derivare alla nostra città, ho creduto opportuno istituire una serie di ricerche destinate a conoscere:

1. Se la posizione di detto cimitero sia stata bene scelta.

2. Se le condizioni fisiche e chimiche del terreno come porosità, permeabilità, contenuto in azoto ecc., siano atte a provocare una rapida decomposizione dei cadaveri.

3. Se i microrganismi contenuti nel terreno vi si trovino in quantità maggiore o maggiormente virulenti, e se vi siano delle specie diverse dalle ordinarie.

4. Se l'acqua che attraversa il sottosuolo del campo Verano, e che quindi scorre al disotto dello strato dei cadaveri, riceva da questi sostanze venefiche, o germi di malattie.

5. Se, e fino a quale grado, l'aria del campo Verano sia alterata nella sua composizione, specialmente in rapporto a sostanze volatili tossiche, od altrimenti dannose ed a microrganismi patogeni.

6. E finalmente se nella statistica della mortalità del numeroso personale addetto a questo cimitero e delle persone che vivono nelle sue adiacenze si riscontrino malattie speciali di intossicazione, od in qualunque modo infettive.

Cenni storici [1]

Durante i primi secoli dell'êra cristiana, per le persecuzioni di ogni specie alle quali i seguaci della nuova religione erano sottoposti, era invalso presso di questi l'uso di seppellire i cadaveri dei loro compagni in cimiteri o catacombe scavate nelle viscere della terra. Il cimitero di Santa Ciriaca, posto sulla via Tiburtina a poca distanza dalla città, era uno dei più celebri dell'antica Roma: aveva preso il nome da questa santa perchè l'agro Ostiano, Varano o Verano nel quale trovavasi era di sua proprietà, e perchè contribuì molto al suo ampliamento e vi fece nel 261 seppellire le ceneri di S. Lorenzo e di vari altri martiri. In seguito anche i suoi resti furono raccolti in questo cimitero. Nell'anno 330 l'imperatore Costantino vi edificò la basilica di S. Lorenzo e le dette in dote il *fundus Veranus* che durante le persecuzioni era stato confiscato a Santa Ciriaca. A ridosso di questa basilica, nelle viscere dell'odierno *pincetto*, si svolge la rete dell'antico cimitero nel quale insieme a molti sarcofaghi cristiani sono stati trovati avanzi numerosi di monumenti pagani: da ciò alcuni vogliono dedurre che, anche prima di rinchiudere le catacombe cristiane, il *fundus Veranus* fosse stato dai pagani adoperato ad uso di cimitero. Cessate le persecuzioni, riconosciuta ufficialmente ed accettata da quasi tutti la religione novella, l'uso delle catacombe e di seppellire i cadaveri sotto terra venne presto abbandonato, e ricchi e poveri fecero a gara per riservarsi un posticino nelle chiese od in altro qualsiasi luogo consacrato. Enormi erano gli inconvenienti prodotti da questo sistema pel quale tutto un popolo di credenti, ristretto nelle chiese ed avvolto nei fumi degli incensi, era solo da una lastra di marmo separato da un ammasso di cadaveri sovrapposti gli uni agli altri ed esalanti i gas i più pestilenziali. Questo sistema tuttavia ebbe sempre la preferenza e, solo durante la peste bubonica del 1656 fu potuto momentaneamente interrompere per la energia di Monsignor Gastaldi, il quale, non lasciandosi vincere da pregiudizi, ordinò l'inumazione dei cadaveri in due cimiteri provvisori posti, l'uno nei Prati di Castello e l'altro nei pressi di S. Paolo.

Passato però lo sgomento prodotto dall'infierire del morbo, si tornò al seppellimento nelle Chiese e vi si persistè fino al principio del secolo nostro quando, durante il pontificato di Pio VII, il governo francese, con decreto imperiale del 27 luglio 1811, stanziava dei fondi speciali per provvedere la città di Roma di cimiteri convenienti.

Furono scelti due vasti terreni, l'uno all'Est della città a lato della Basilica di S. Lorenzo e sulle antiche catacombe di Santa Ciriaca, e l'altro

[1] Buona parte di queste notizie le ho prese da una monografia dell'ingegnere M. Moretti non ancora pubblicata.

all'Ovest nella vallata che è denominata dalle rovine della vigna Sacchetti. I lavori furono spinti con tanta attività che alla fine del 1813 il cimitero dell' Est era quasi terminato e quello dell'Ovest molto progredito. Furono scavate 400 fosse disposte in quattro grandi quadrati, divisi fra loro da viali e circondato il tutto da un muro di cinta presso il quale fu scavata un'altra fila di fosse per le famiglie che avessero voluto eriggervi dei monumenti, Questa disposizione osservasi ancora al giorno d'oggi nel grande quadriportico che trovasi appena attraversato il cancello principale.

« I morti di ciascuna giornata (secondo quanto scrive il conte De-Tournon « rappresentante del governo francese in Roma) dovevano esser depositati « involti in un semplice lenzuolo, in una sola fossa che, chiusa la sera, non « sarebbe stata riaperta che alla fine dell'anno, spazio di tempo riconosciuto « sufficiente per produrre la essiccazione dei cadaveri e per distruggere i « gas che essi sviluppano. Cosí le 400 fosse avrebbero costituito, oltre al « mezzo di seppellimento giornaliero, una riserva pei casi di epidemia. Dopo « un certo numero di anni, le ossa disseccate, sarebbero state, come si « pratica nella chiese, levate e deposte negli ossari; » e a tale scopo fu scavata una fossa ad ognuno dei quattro angoli del cimitero. Trattavasi quindi, come si vede, non di una vera inumazione; ma semplicemente di deporre i cadaveri, l' uno vicino all'altro, in grandi cavi sotterranei (detti in seguito fosse carnarie) separati dall'esterno per mezzo di una semplice lastra di marmo.

Nonostante però che con tanta alacrità fossero stati intrapresi i lavori, cessata l'occupazione francese, non si fece più nulla in proposito ed i lavori già fatti rimasero completamente abbandonati, tanto che il cimitero al pigneto Sacchetti, convertito per le fosse scavatevi in una vasta pozzanghera, era, non si sa come, tornato nuovamente proprietà privata.

Il Pontefice Gregorio XVI riprese a cuore la questione, fece accrescere e spurgare le fosse già scavate al cimitero del Verano, vi eresse una cappella e ne ultimò i lavori.

Ai dì 3 di settembre dell'anno 1835 il cardinale Carlo Odescalchi, vicario di Roma, ne fece la solenne inaugurazione.

Nello stesso anno, d'ordine del Pontefice fu vietata la tumulazione dei cadaveri nelle chiese e nell' interno della città; tranne che nelle sepolture gentilizie ed in quelle delle corporazioni religiose.

. Il sistema però delle fosse carnarie inauguratosi al cimitero del Verano, e per la loro scarsezza, e per le esalazioni pestilenziali che ne derivavano, provocò tale un numero di reclami che spinsero il governo a provvedere per un più acconcio seppellimento.

Dopo molte discussioni e dietro il parere di una commissione nominata a tale scopo, prevalse l'opinione di inumare i cadaveri, di seppellirli cioè a contatto diretto della terra, rinchiusi ognuno in un'apposita cassa di legno. Furono espropriati i terreni vicini al campo Verano, furono recinti di mura e, nel 1851, tale genere di seppellimento incominciò ad andare in vigore.

Tuttavia e per la riluttanza che la popolazione romana aveva sempre

mostrato per questa nuova forma di seppellimento e per l'acquiescenza del governo pontificio, il seppellimento nelle chiese, fino al 1870, non fu mai completamente abbandonato.

Stato presente.

Vietato assolutamente dalle nuove leggi il seppellimento dei cadaveri nell'interno della città, il cimitero di Roma, estesa moltissimo la sua cinta, presenta al giorno d'oggi una superficie di circa 1 milione di metri quadrati. Lo spazio destinato al seppellimento comune è di m. q. 138,000: tutto il resto è occupato dal seppellimento privato e dalla rete stradale che, misurata linearmente, ha una lunghezza di m. 22,000. Ai due lati delle singole strade si trova una cunetta in selciatura od in cemento destinata allo smaltimento delle acque piovane. La fognatura scorre al disotto delle strade e, passando vicino al Forno crematorio, dopo attraversata la via Tiburtina va a sboccare nel fosso detto della Marranella.

Intorno ai vari riquadri di terreno destinato al seppellimento, e lungo tutto il percorso della rete stradale, si trovano numerosissimi alberi, in special modo cipressi e pini, ed una grande quantità di piantagioni di edera e di erbe odorose, come oleandri, acacie, rose.... L'uso di piantare alberi nei cimiteri, di trasformare questi luoghi di tristezza in giardini lussureggianti di erbe e di fiori, risale alla più remota antichità e risponde ad un intimo senso di poesia, che ci porta quasi a considerare questa nuova manifestazione di vita sulle ceneri dei nostri cari come una continuazione, una nuova espressione della loro vita stessa. Utilissimo poi è questo uso anche dal punto di vista dell'igiene, giacchè è noto che i vegetali decompongono l'acido carbonico assorbendone il carbonio ed emettendo grandi quantità di ossigeno libero: purificano perciò l'aria da uno dei prodotti che in maggior quantità passa dalle tombe ad inquinarla. Ad un'altra importantissima azione epuratoria sono altresì utili le piante per mezzo delle loro radici. Finchè la decomposizione dei cadaveri è molto attiva e da essi emanano in abbondanza liquidi e gas fetidi ed impropri alla vita, le radici dei vegetali sovrastanti si dirigono altrove a cercare un nutrimento più acconcio. Quando però la materia organica ha subìto una prima alterazione e la fermentazione putrida è cessata per dar luogo alla fermentazione secca, le più sottili diramazioni delle fibrille radicali si gettano sui residui della sostanza organica, li circondano come in una rete e per mezzo dei loro succiatoi, aspirano e, sotto forma di foglie e di fiori, riportano alla luce sostanze che già erano state componenti essenziali dell'individuo ivi decomposto. Questa è la vera circolazione della vita e ci prova come il nostro sentimento non c'inganna quando ci rende così cari i fiori nati sulle tombe. La grande cura che si ha degli alberi e delle aiuole nel nostro cimitero al Verano, è quindi ragionevolissima ed è anzi a desiderare che sia anche estesa, come un tempo,

a quelle piantagioni di cipressi che trovansi avanti al suo ingresso principale.

Il seppellimento dei cadaveri non viene fatto esclusivamente per inumazione. o mettendo le casse, che devono sempre essere di legno, a contatto diretto della terra; ma anche rinchiudendo i cadaveri in una cassa di zinco e deponendoli semplicemente dentro le tombe private o cappelle o loculi di deposito. Il numero di queste tombe o seppellimenti privati giunge a circa 14,000.

Il seppellimento comune viene fatto nel modo seguente: tutto il terreno destinato a questo scopo è stato diviso, dalla estesissima rete stradale, in tanti riquadri della grandezza ognuno di circa 1800 m. q. Si incomincia in uno di questi riquadri a scavare una fossa lineare, parallela ad uno dei suoi lati ed estesa per tutta la sua lunghezza. La profondità di questa fossa è di metri 2 tanto per gli adulti, che pei bambini: la sua larghezza, di m. 1. I due primi cadaveri che occorre inumare vengono calati dentro questa fossa l'uno accanto all'altro, però disposti in modo che i piedi dell'uno vengano a trovarsi a livello della testa dell'altro. Ciò è fatto tanto per facilitare la ricerca di un dato cadavere nel caso che se ne debba fare l'esumazione, quanto, data la forma a triangolo tronco della cassa, per economia di spazio. Ricoperti di terra questi due primi cadaveri, i seguenti vengono inumati parimenti a coppia ed incrociati finchè tutta la lunghezza della fossa ne è riempita. Allora si procede a scavare una nuova fossa lineare parallela alla prima e distante da essa m. 0,80 e si continua in questo modo per tutta l'estensione del riquadro. I bambini invece che a due, sono disposti a quattro; l'uno accanto all'altro e parimenti incrociati. Data la grandezza media di m. q. 1800 dei riquadri esistenti al Campo Verano, il numero dei cadaveri che ognuno di essi può contenere sarà di 1100 per gli adulti e di 3000 pei bambini Dopo che in questo modo tutto il riquadro è stato riempito, il che nella mortalità media di Roma richiede 2 3 mesi di tempo, per la durata di dieci anni non si fa più su di esso lavorazione alcuna tranne l'infissione di croci per opera di parenti, o la coltivazione di piccole aiuole. Terminati i 10 anni si procede, filone per filone, al dissotterramento dei resti ossei che, liberati dagli avanzi della cassa e dalle impurità del terreno, vengono tutti insieme deposti nel grande ossario comune. Il riquadro in tal modo espurgato, viene lasciato a se stesso per più o meno tempo, per poi ricominciarvi. nel modo descritto, un'altra serie di inumazioni.

Il *grande ossario* nel quale vengono deposti i resti trovati nello spurgare i vari riquadri è di recente costruzione. Fino al 1891, essendo stato aumentato moltissimo il terreno destinato al seppellimento, non si era sentito il bisogno, per inumare nuovi cadaveri, di espurgare i riquadri antichi; ed oltre a ciò, si era ricorso al sistema di seppellire i cadaveri a due e perfino a tre strati sovrapposti gli uni agli altri. Occupato però tutto lo spazio disponibile, ed abbandonato il seppellimento a strati sovrapposti, la creazione di un ossario per raccogliervi i resti trovati nello espurgare i riquadri, si rese necessaria.

Fu scavata a questo scopo, nel mezzo del terreno destinato al seppellimento comune, una grande fossa di circa 9000 m. c., riparata tutto intorno da pareti in muratura e superiormente comunicante coll'esterno per mezzo di 12 chiusini. Nel 1892 vi si cominciarono a trasportare tutte le ossa esumate, ed al giorno d'oggi vi si trovano gli avanzi di più di 100,000 cadaveri.

Cremazione. — Nel 1880 si costituí in Roma una società per la cremazione dei cadaveri, e ad essa il Comune concesse gratuitamente un'area per la costruzione di un forno crematorio. Dei vari sistemi proposti per questi forni, fu prescelto quello del Gorini, che è costituito da una fornace, da una camera di cremazione e da un camino per l'esportazione dei gas e dei prodotti della combustione. Il cadavere viene disposto longitudinalmente nella camera di cremazione sopra una griglia metallica: un po' più in basso ed a lato di questa camera, ma comunicante con essa per una grossa apertura, trovasi la fornace, nella quale vengono accese le legna. Le fiamme attraversano in senso longitudinale la camera di cremazione, investendo il cadavere dalla testa ai piedi; appresso, ed al disotto di questi incomincia il camino che scende perpendicolarmente in basso, scorre quindi orizzontale sotto al cadavere, per poi salire verticalmente e terminare libero al disopra del tetto. In questo modo il cadavere viene tutto circondato dalle fiamme prima che i prodotti della combustione salgano nella canna del camino dove, a purificarli maggiormente trovasi un cestino di carbone coke incandescente. L'apertura del forno trovasi lateralmente alla camera di cremazione, è conformata ad arco e si chiude mediante una saracinesca di ferro foderata di terra refrattaria.

Ogni combustione richiede circa 4 lire di legna, ed è completa solo dopo 2-3 ore.

Le ceneri e le ossa rimaste sono rinchiuse in una piccola urna di terracotta ed, in attesa che si costruisca un adatto cinerario, vengono conservate in una camera del fabbricato al disopra dell' ingresso principale.

Personale. — Oltre ad un ispettore e a due impiegati, ai quali tutti sono gratissimo per la gentilezza con cui mi hanno facilitato queste ricerche, il personale del cimitero al Verano è costituito da 25 guardiani e da 19 terrazzieri o fossori incaricati specialmente dei lavori di sterro. Al taglio delle erbe che si sviluppano al di sopra dei riquadri, è destinato un falciatore: le erbe, riunite in cumuli, vengono abbruciate. Il cancello è guardato da due portieri che prestano servizio per turno. Nei mesi da gennaio ad aprile, nei quali sono eseguiti i lavori di spurgo, il numero dei terrazzieri non è più sufficiente e se ne prendono in servizio altri 30-40, a seconda del bisogno.

Ricerche sperimentali.

Terreno.

Struttura geologica e composizione chimica. — Il terreno del cimitero di Roma è, per tutta la sua estensione, un terreno vulcanico prodotto dalle deiezioni dei crateri dei colli albani. Questo terreno è composto quasi per intero di tufo di consistenza varia e mescolato ad una piccola quantità di ciottoli. Presi in vari punti del cimitero alcuni pezzi di questo tufo e sottoposti all'esame chimico si riscontrano per la massima parte composti di silicati di alluminio e di calcio, mescolati ad una discreta quantità di ferro: vi si notano anche traccie di solfati e di magnesio, potassio, sodio..... I carbonati mancano assolutamente: la *reazione* è leggermente alcalina.

In qualcuno dei punti maggiormente avvallati si sono fatti dei riempimenti con terreno di scarico (terreno vegetale, pozzolana, calcinaccio, rottami.....) e ciò tanto per lavori di livellazione quanto allo scopo di tener lontana la falda liquida sotterranea.

Per conoscere la quantità delle sostanze organiche contenuta nel terreno, ho creduto sufficiente determinare, col metodo Kjeldahl, la quantità di azoto totale: essa in media corrisponde a 0.04 %.

Grandezza dei grani. — Per conoscere la proporzione nella quale i grani di varia grandezza si trovano nel terreno, mi sono servito del metodo dello stacciamento del Müencke. Dai risultati dei vari esami fatti si può ammettere che il terreno del Campo Verano abbia, in rapporto alla grossezza dei grani, la composizione seguente:

Grani di grandezza	superiore	ai	7	mm.	13 %
»	»	»	4	»	14 »
»	»	»	2	»	16 »
»	»	»	1	»	14 »
»	»	»	0,5	»	19 »
»	inferiore	»	0,5	»	24 »

Questo terreno deve quindi essere considerato come composto di grani di mezzana grandezza, attraverso i quali perciò sarà facile la circolazione dell'aria. Per conoscere tuttavia più esattamente come questa circolazione avviene, ho voluto misurare il volume dei pori e

la quantità d'aria che, nell'unità di tempo, può passare attraverso questo terreno sotto una piccola pressione.

Volume dei pori. — Il metodo maggiormente adoperato per determinare il volume dei pori di un dato terreno, è quello di Flügge. Si fa penetrare nel terreno da esaminare un cilindro di ferro vuoto, in modo da poter asportare una data quantità di terreno senza modificare la distanza che i singoli granuli hanno fra di loro. Quindi, per mezzo di una corrente di acido carbonico, si scaccia tutta l'aria contenuta nei pori di questo terreno e la si fa penetrare in una campanina graduata. Il volume, osservato in questo modo, si riduce a 0° e 760. Dai vari esami fatti, risulta una percentuale media di 56: il che vuol dire che di 100 cc. di terreno, 44 cc. sono realmente rappresentati dal terreno, e 56 cc. sono dati dai pori o dall'aria in essi contenuta.

Permeabilità all'aria. — Lo stesso cilindro di Flügge, adoperato per misurare il volume dei pori, è anche utilissimo per farci conoscere la permeabilità di un terreno rispetto all'aria. Riempito il cilindro di terreno nel modo suddetto, lo si fa attraversare da una data quantità di aria, tenendo conto nello stesso tempo della pressione di questa e dell'umidità del terreno. Ciò è assolutamente necessario, variando moltissimo i risultati a seconda che variano queste condizioni. Dalle varie ricerche da me eseguite, posso stabilire che un cilindro di terreno del Campo Verano, dell'altezza di 20 cm. e della larghezza di 6 cm. con una umidità di 77 $^0/_{00}$, viene attraversato in un'ora da 42 litri d'aria che si trovino sotto una pressione di 2 mm. di mercurio.

Microrganismi contenuti nel terreno. — I lavori di dissotterramento e la poca coesione del terreno del campo Verano, rendono facilissima la presa dei campioni e l'esame dei germi che si trovano nel terreno a varie profondità. In tutto il periodo di queste ricerche mi sono occupato quasi esclusivamente della ricerca dei germi patogeni e mi sono servito a questo scopo delle culture aerobiche ed anaerobiche e delle iniezioni in animali. Credo inutile dilungarmi nella descrizione dei metodi che ho adoperato per ottenere le culture suddette e mi limiterò solo a nominare i microrganismi più importanti che ho quasi costantemente riscontrato nel terreno. Essi sono: il bacillo del pseudoedema maligno, che è il più diffuso, poi il bacillo dell'edema maligno, il bacillo del tetano e qualche volta lo streptococco settico. Tutti questi microrganismi si trovano indifferentemente tanto alla superficie del terreno quanto sino a 2-3 metri di profondità. Tra i microrganismi non patogeni, non ne ho trovato alcuno degno di nota: e trattasi sempre

di quegli stessi microrganismi che siamo soliti a trovare in quasi tutti i terreni specialmente coltivati.

Falda liquida sotterranea.

Qualunque sia l'origine delle acque del sottosuolo di questa regione, provengano esse o no dai laghi dei colli Laziali, è fuori di dubbio che le precipitazioni atmosferiche debbono avere su di esse un' influenza grandissima. Le prime acque di pioggia che cadono sopra un terreno, ad eccezione di una certa quantità che ne evapora allo stesso momento o che scorre in rigagnoli alla sua superficie, vengono dal terreno stesso assorbite e completamente ritenute. Persistendo però le pioggie, il terreno si satura di acqua e la sua capacità di assorbimento non è più sufficiente a trattenerla. In tal caso, dopo attraversato tutto lo strato di terreno che si trova fra la sua superficie ed il livello della falda liquida sotterranea, l' acqua piovana penetrerà in questa, modificata nella sua composizione a seconda della qualità del terreno che avrà attraversato. Per impedire quindi che un'acqua, proveniente dal sottosuolo di un cimitero e che perciò in parte ha attraversato tutto lo strato di terreno nel quale vengono fatte le inumazioni ed ha bagnato i cadaveri stessi possa in seguito penetrare nei nostri pozzi, si preferisce che i cimiteri abbiano una posizione meno elevata di quella della vicina città e che l'acqua che scorre al disotto di essi abbia una direzione diversa da quella dei pozzi.

Il terreno del cimitero di Roma non è tutto in piano ma presenta anzi dei fortissimi dislivelli: la stessa irregolarità si manifesta anche nella profondità della falda liquida sotterranea. Dai numerosi lavori di scavo fatti in questo terreno risulta che nei punti più elevati la falda liquida trovasi ad una profondità anche superiore ai 7 m.; mentre nei più avvallati trovasi già a m. 2.90.

La mancanza di pozzi regolarmente disposti mi ha impedito di poter stabilire con esattezza la via percorsa da queste acque e verso quale punto esse vadano a scaricarsi.

Tuttavia dallo studio della struttura geologica del terreno e dagli scavi fatti nell' interno del Campo Verano e fuori di esso si può, con piena sicurezza ammettere, che le acque provenienti dal sottosuolo del nostro cimitero, invece di prendere la direzione della città, attraversano la via Tiburtina e dopo un tragitto di circa m. 500 si scaricano nel fosso detto della Marranella il quale sbocca nell'Aniene poco prima della sua immissione nel Tevere.

Quantunque questa via indiretta fosse già per se sola sufficiente a farci escludere l'inquinamento delle acque dei nostri pozzi, ho creduto tuttavia utile ricercare, per mezzo di analisi chimiche e batteriologiche quale sia il grado di purezza di tali acque. Per raggiungere questo scopo ho fatto scavare un pozzo in uno dei punti piu avvallati del Campo Verano e situato a considerevole distanza dalla sua periferia, in modo da essere sicuri che l'acqua che vi si raccoglie ne abbia attraversato almeno una parte. Il pozzo è stato scavato circa 18 mesi fa; e durante tutto questo periodo di tempo ho fatto della sua acqua numerosi esami.

Caratteri fisici ed organolettici. — *Temperatura* 13°. — 17°.

Colore. Mettendo in un cilindro di vetro una data quantità di acqua di questo pozzo e paragonandola con ugual cilindro contenente la stessa quantità di acqua distillata, solo qualche volta si è trovato che la prima possedeva una colorazione giallastra appena visibile.

Odore: nullo o leggermente terroso.

Esame chimico. — *Reazione* leggermente alcalina.

Residuo secco. L'ho ottenuto lasciando evaporare 500 cc. di acqua ed essiccando poi il residuo per qualche tempo alla temperatura di 110°.

Ammoniaca. Trattandosi sempre di quantità minima, mi sono limitato a fare solo la ricerca qualitativa col reattivo del Nessler.

Cloro. Le determinazioni le ho sempre fatte servendomi del metodo volumetrico: la soluzione titolata era la centinormale di nitrato d'argento; l'indice il cromato potassico.

Acido nitrico. Colla reazione di Schultze-Tiemann ho raccolto in una campanina graduata la quantità di biossido di azoto proveniente dall'evaporazione di tre litri di acqua. Da questa quantità, tenendo conto della temperatura e della pressione, ho dedotto la quantità di acido nitrico esistente in 1000 cc. d'acqua.

Acido nitroso. Ne ho fatto solo la ricerca qualitativa giacchè la quantità di questo acido nell'acqua del sottosuolo del campo Verano è appena sensibile. Mi sono servito della reazione dell'acido solfo-anilico e dell'α. naftilammina, o reazione di Griess, che è sensibilissima.

Sostanze organiche. Per la determinazione di tali sostanze ho praticato il metodo di Kubel valutando con esso la quantità di ossigeno necessaria ad ossidarle.

Anidride fosforica. Ne ho sempre fatto la determinazione trattando il residuo di 500 cc. di acqua ripreso con acido nitrico diluito, con un eccesso di molibdato d'ammonio.

Durezza totale. Per la sua determinazione mi sono servito del metodo di Boutron-Boudet; il grado idrotimetrico è considerato corrispondente a gr. 0.01 di carbonato di calcio per litro.

Riassumo qui in una tabella i risultati ottenuti dai singoli esami, mettendoli a confronto coi risultati ottenuti dai dottori Marino-Zuco e Fabris in alcune acque del sottosuolo di Roma.

Per 100,000 parti d'acqua	Campo Varano	Tor Pignatara	Palazzo della Prefettura	Piazza di Trevi	Porta Pia	Villa Lodovisi	Borgo S. Spirito	Acqua Lanciziana alla Lungara
Residuo fisso . . .	42,00	51,2	77,6	48,2	39,6	33,0	84,0	71,4
Durezza totale in gradi francesi . .	35,00	33,18	36,66	26,62	25,12	21,50	46,45	54,50
Cloro	3,87	2,804	6,780	3,159	1,207	1,388	8,662	7,064
Anidride nitrica . .	5,60	3,657	18,978	4,726	1,832	1,912	14,709	9,170
Sostanze organiche (ossig. consumato)	0,08	0,0492	0,0352	0,0320	0,0976	0,0292	0,0380	0,0640
Anidride nitrosa. .	tracce	tracce	tracce	tracce	0	0	tracce	0
Ammoniaca. . . .	tracce	tracce	0	0	0	0	tracce	0
Anidride fosforica .	tracce	molta	molta	molta	tracce	tracce	molta	poca

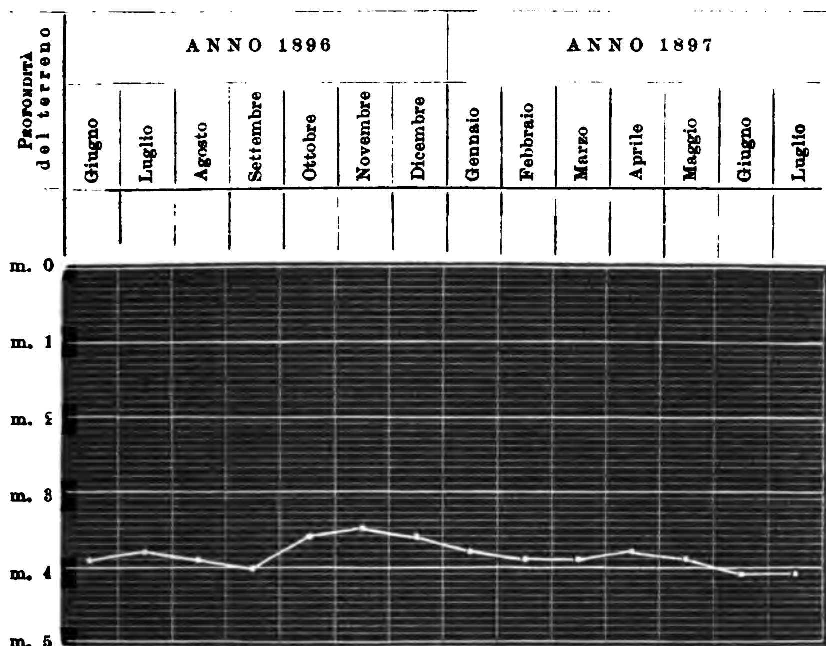
Esame batteriologico. — I microrganismi che hanno maggiore interesse in queste ricerche sono in particolar modo i patogeni ed i batteri intestinali; è quindi di questi che mi sono esclusivamente occupato. Dagli esami batteriologici fatti nel terreno si è veduto che numerosi germi patogeni, aerobi ed anaerobi, si possono trovare sino a 3 m. di profondità: questo fatto, facilmente spiegabile coi continui rivolgimenti del terreno, rendeva plausibile il sospetto che anche la falda liquida sotterranea fosse in modo simile inquinata. Ho fatto in queste acque una numerosa serie di ricerche, specialmente in rapporto al *bacterium coli* ed ai germi delle malattie infettive più comuni, ed ho sempre ottenuto risultati negativi. La spiegazione di questo fatto va

senza dubbio ricercata nelle condizioni fisiche del terreno le quali, nello strato sovrapposto ai cadaveri, sono diverse da quelle che riscontransi nello strato ad essi sottoposto. Ed infatti, in questo secondo strato il terreno, più compatto e meno permeabile all'aria, è pochissimo adatto a mantenere in vita i germi più comuni delle malattie ed a lasciarsi da essi attraversare. Il terreno in questo modo agisce come un vero filtro tanto che ne basta uno strato di appena 2 m. per impedire che gli innumerevoli germi di un cadavere in putrefazione vadano a riversarsi nelle acque sottostanti. Non intendo con ciò di dire che tali acque siano sterili; esse contengono invece numerosissimi microrganismi, tra i quali primeggia il vibrio saprophiles, appartenenti tutti però a specie completamente inoffensive e punto diverse da quelle che si riscontrano così di frequente nei vari pozzi della nostra città.

Variazioni di livello. — Le variazioni di livello alle quali va soggetta l'acqua del sottosuolo sono in particolar modo sottoposte alla caduta delle pioggie e seguono perciò, abbastanza da vicino, le oscillazioni di queste.

Alle variazioni dell'acqua del sottosuolo è stata attribuita grande importanza per l'insorgere di talune malattie e ciò in rapporto al fatto che aumentando il livello di queste acque l'aria, scacciata dal terreno ad esse sovrastante e mescolatasi all'aria libera, potesse trasportare in questa i germi delle malattie infettive che trovansi nel terreno. Colle variazioni di livello delle stesse acque vengono anche oggi, da Pettenkofer e da altri, spiegate le alternative di alcune malattie infettive ed in particolar modo della febbre tifoide. Checchè ne sia di tutto ciò, le oscillazioni della falda liquida sotterranea ci danno un criterio importantissimo per farci razionalmente giudicare dell'umidità di un terreno e ci fanno conoscere fino a quale altezza queste acque possono arrivare. Ciò è di importanza massima, specialmente nei cimiteri, nei quali le oscillazioni della falda liquida non devono in nessun caso arrivare all'altezza dello strato di terreno destinato al seppellimento.

Nella tavola seguente sono indicate le oscillazioni alle quali la falda liquida sotterranea è andata soggetta durante tutto il periodo delle presenti ricerche.



Aria.

Per avere delle conoscenze il più possibilmente esatte intorno alla composizione chimica e batteriologica dell'aria del campo Verano, ho creduto necessario eseguire una serie di ricerche tanto sull' aria che circola liberamente al disopra del terreno, quanto su quella che trovasi nell' interno di esso. In tutte le ricerche da me eseguite sulla composizione e sui microrganismi dell'aria libera al disopra del terreno, ne ho sempre fatto la presa a circa 25 c.m. dalla superficie ed ho sempre curato di scegliere giornate ed ore calmissime nelle quali i movimenti dell'aria potessero essere considerati come nulli. È evidente infatti che se le ricerche fossero eseguite in un momento di vento, l'aria esaminata non potrebbe essere considerata come quella propria del campo Verano; ma sarebbe invece un'aria che, proveniente da un luogo qualsiasi, trovasi in quel dato momento a passare al disopra di esso. Per esaminare l'aria contenuta nei pori del terreno, mi sono sempre servito di un tubo di ferro che veniva infisso nel terreno alla profondità voluta ed attraverso il quale, per mezzo di una pompa, veniva aspirata l'aria.

Ricerche chimiche. — *Acido carbonico*. Mi sono sempre servito del metodo titrimetrico del Pettenkofer, raccogliendo l'aria ora dentro un pallone ed ora facendola passare per vario tempo attraverso il tubo che porta il nome dello stesso autore.

Ammoniaca. Tale ricerca è stata fatta facendo passare 20 litri di aria attraverso ad una data quantità di acqua leggermente acidificata con acido solforico ed eseguendo poi su questo liquido la reazione del Nessler.

Acido nitrico. Ho fatto passare 100 litri di aria attraverso ad una data quantità di acqua distillata ed ho eseguito poi su questa la reazione della brucina.

Acido nitroso. Sulla stessa acqua distillata adoperata per l'acido nitrico ho eseguito la ricerca dell'acido nitroso colla reazione del Griess.

Acido solfidrico. Ne ho fatto la ricerca facendo passare 100 litri di aria attraverso ad una soluzione alcalina di nitro-ferricianuro di sodio.

Sostanze organiche. La determinazione è stata fatta applicando il metodo di Kubel come per la ricerca delle sostanze organiche nella falda liquida del sottosuolo.

Riassumo nella tabella seguente i risultati ottenuti nei singoli esami:

PER 1000 D'ARIA	Libera al disopra del terreno	Rinchiusa nell' interno di esso alla profondità di m. 1,5
Acido carbonico	0,31 — 0,33 — 0,42	3 — 6,2
Ammoniaca	0	tracce
Acido nitrico	0	0
Acido nitroso	0	tracce
Acido solfidrico	0	0
Sostanze organiche per 1 m. c. di aria.	mgr. 0,2 di ossigeno consumato.	mgr. 12,5 di ossigeno consumato.

La cifra di 0,42 °/oo di acido carbonico, osservata nell'aria libera al disopra del terreno, è certamente molto elevata: tale osservazione però è stata fatta solo una volta e si può facilmente spiegare osservando il modo di comportarsi della pressione atmosferica: dopo un'altezza di mm. 751.3 a cui la colonnina barometrica trovavasi il mattino, si era avuto un rapido abbassamento e nel momento della ricerca la colonnina barometrica trovavasi a mm. 746,5. Da ciò avvenne che l'aria rinchiusa nel terreno, trovando diminuita la pressione esterna, era uscita fuori

trasportando seco una grande quantità di acido carbonico. Questo è il fatto che avviene quasi sempre prima della pioggia e ci spiega l'origine di quello speciale odore di terra che si percepisce in tali circostanze.

Ricerche batteriologiche. — Per la ricerca dei microrganismi contenuti nell'aria libera al disopra del terreno e nell'aria rinchiusa nell'interno di esso, mi sono sempre servito del metodo del Petri. Attraverso ad un tubo contenente un filtro di sabbia sterilizzata facevo passare 10-20 litri dell'aria da esaminare e quindi, mescolando questa sabbia ad un po' di acqua sterilizzata e facendone delle culture, osservavo la quantità e le specie dei microrganismi contenutivi.

Credo utile riunire nella tabella seguente i risultati medii ottenuti nei vari esami fatti, mettendoli a confronto coi risultati ottenuti da altri ricercatori e da me in località diverse.

BATTERI PER 1 m.c. DI ARIA	
Parigi (Miquel)	3480
Berna (Freudenreich)	580
Firenze (Roster)	602
Roma: Torre del Campidoglio (Santori)	974
Roma: Monte Pincio (Santori)	425
Campo Verano (Santori)	496
Parco di Montsouris (Miquel)	477

Ricerche relative alla morbilità ed alla mortalità delle persone addette al Campo Verano o che abitano nelle vicinanze di esso.

Delle numerose persone (circa 50) addette permanentemente al Campo Verano e che, come guardiani o come terrazzieri, passano dentro di esso gran parte della giornata e, per turno, anche della nottata, è facile seguire il numero ed il genere delle malattie. Nè l'uno nè l'altro presentano nulla che sia in qualche modo degno di osservazione; che se anzi prendiamo altrettanti individui occupati dalla stessa amministrazione comunale in lavori consimili in altri punti della nostra città, troviamo che in ambedue i gruppi di individui, il numero ed il genere delle malattie sono perfettamente gli stessi.

Dal parere concorde dei medici esercenti nel quartiere tiburtino e che hanno occasione di conoscere e di curare tutto quel gruppo di individui che lavorano che vivono nelle vigne e nei terreni che circondano il cimitero del Campo Verano, si può con piena certezza asserire che di tutte le malattie che si osservano in queste località, nessuna può in una maniera qualsiasi, venire attribuita a tale vicinanza.

Osservazioni generali e conclusione.

Le norme principali che vengono generalmente date per la costruzione di un cimitero riguardano in particolar modo la sua *posizione* rispetto alla città, la natura del *terreno* e la distanza dalla sua superficie delle *acque del sottosuolo*. Vediamo ora se le condizioni del cimitero comunale di Roma al Campo Verano corrispondano a queste norme.

Posizione. Il cimitero del Campo Verano trovasi, come abbiamo veduto, a levante della città ed in uno dei punti più elevati di essa. Le sue parti più basse trovansi ad una quota di m. 21, cioè a circa m. 10 al disopra delle parti più basse della città. Questa posizione elevata che per se stessa, a cagione delle acque che dal sottosuolo del cimitero potrebbero penetrare nei pozzi della città, dovrebbe essere ritenuta sfavorevole, non può in nulla venire sospettata nel caso nostro. Abbiamo veduto difatti che tali acque, invece di prendere la direzione della città, attraversata la via Tiburtina, si scaricano nel fosso detto della Marranella che sbocca nell'Aniene poco prima della sua immissione nel Tevere. Potremmo poi anche portare a favore della posizione elevata del cimitero il fatto della più facile circolazione dell'aria la quale, continuamente rinnovandosi, diluirà all'infinito i gas tossici che possono svilupparsi dai cadaveri in decomposizione.

Qualità del terreno. Le condizioni principali alle quali deve soddisfare un terreno perchè sia adatto alla rapida e completa decomposizione di un cadavere, sono inerenti alle sue proprietà fisiche e chimiche. La reazione del terreno deve essere alcalina, essendo la presenza di basi necessaria all'acido nitrico, che si sviluppa in abbondanza, per formare i nitrati. Il terreno non deve essere molto compatto, ma poroso e facilmente permeabile all'aria. La ragione di ciò risulta facilmente da quello che si è detto intorno ai vari processi di decomposizione, e cioè che un cadavere sarà tanto più facilmente decomposto ed i suoi prodotti saranno tanto più innocui, quanto maggiore sarà la quantità di aria che vi circola intorno.

L'acqua del sottosuolo deve trovarsi ad una discreta distanza dallo

strato di seppellimento e non deve mai raggiungere quest'altezza neanche nelle sue massime piene.

Dai risultati ottenuti dalle varie ricerche fatte sulle proprietà fisiche e chimiche del terreno e dalle misure delle oscillazioni della sua falda liquida, è facile vedere come nel nostro cimitero non manchi alcuna delle condizioni suddette.

Appurato quindi che le condizioni del cimitero comunale di Roma sono conformi a quelle prescritte, resta ora a vedere se, dalle ricerche fatte, si possa conchiudere che queste condizioni corrispondano allo scopo e se il terreno, l'acqua e l'aria del Campo Verano siano o no inquinate e producano, in un modo qualsiasi, un pericolo per la nostra città.

Allo scopo di conoscere il grado di inquinamento del *terreno*, ho eseguito due specie di ricerche; quella delle sostanze organiche o dell'azoto in esso contenuto, e quella del numero e della qualità dei microrganismi. Abbiamo già veduto che la quantità dell'azoto è minima (0,04 °|o), e se si mette a confronto con quella che si trova comunemente nei giardini e nei campi coltivati, questa cifra ci sembrerà assolutamente insignificante. Questo risultato poi è anche importante perchè ci dimostra che la combustione delle sostanze organiche avviene in un modo completo, e che non è punto vero ciò che comunemente si crede che cioè il terreno dei cimiteri sia eccessivamente grasso. Esso invece, soggetto continuamente ad un incessante lavorio di mineralizzazione e lasciandosi asportare dalle piante e dalle acque i vari prodotti delle decomposizioni cadaveriche, è sempre pronto (purchè tra un' inumazione e l'altra decorra un certo tempo ed il terreno sia convenientemente smosso) a decomporre sostanze nuove. [1]

Quanto poi ai microrganismi che si trovano nel terreno, non diversificano punto nè pel numero, nè per la qualità da quelli soliti a trovarsi in tutti i terreni specialmente coltivati. Il bacillo del pseudo-edema maligno, quello dell'edema maligno e del tetano e lo streptococco settico si trovano quasi costantemente nei più svariati terreni; e gli altri microrganismi come quello della tubercolosi, del tifo e di altre malattie che non hanno nei terreni residenza abituale, ma che tuttavia sono trasportati in abbondanza nei terreni dei cimiteri, sono, come è stato provato da numerose esperienze, dal terreno stesso rapidamente distrutti.

L'*acqua del sottosuolo* del Campo Verano non può certamente es-

---

[1] E che il terreno del Campo Verano conservi ancora un elevatissimo potere mineralizzatore, lo prova pure la rapidità colla quale vi si verifica la decomposizione dei cadaveri.

Su questo argomento verranno pubblicate speciali ricerche, corredate da numerose tavole fotografiche, dai dottori Tito Gualdi e Pietro Ambrogetti.

sere messa a confronto con le buone acque di sorgente; ma paragonata alle acque dei pozzi della nostra città, tanto diverse fra loro per la provenienza, per condizioni di terreno e per maggiore o minore vicinanza dell'abitato, non presenta davvero un grado di inquinamento molto diverso da queste. L'azione epuratoria del suolo ed il suo alto potere filtrante difendono la falda liquida sotterranea da un soverchio inquinamento.

Per ciò che riguarda l'inquinamento dell'*aria*, non vi è, chimicamente parlando, la minima differenza fra quella del Campo Verano e quella dei giardini anche i meglio conservati. I gas e le sostanze tossiche che in essa versano i cadaveri in decomposizione, si trovano in una diluzione tale che non bastano a scoprirle i reattivi più sensibili. Qui del resto è utile intendersi riguardo a queste celebri sostanze tossiche. Che nella decomposizione putrida di una sostanza organica qualsiasi si formino delle sostanze tossiche (ptomaine), è cosa oramai fuori di dubbio; che però queste sostanze possano dall'aria o dall'acqua essere portate via e con esse diffuse nell'ambiente, non è molto attendibile, e ciò per due ragioni: 1ª perchè generalmente non si tratta di sostanze volatili; 2ª perchè il loro equilibrio molecolare è tale che basta a decomporle la più piccola azione fisica o chimica, e l'attraversare uno strato di terreno dello spessore di 2 m. sarà quindi certamente sufficiente a questo scopo.

Anche riguardo ai microrganismi, le numerose ricerche di altri e mie ci fanno assolutamente escludere che l'aria dei cimiteri possa in qualche modo riuscire dannosa. Le varie specie patogene che si trovano costantemente nel terreno, o che dai cadaveri passano in esso, non riescono quasi mai a sollevarsi nell'aria, ed, in ogni caso, si troveranno in essa tanto diluite, che l'aria di un cimitero sarà sempre da considerarsi come meno infetta di quella di certe abitazioni umane, o di una strada qualsiasi in cui trovinsi riunite molte persone.

La conclusione più importante che può essere dedotta da tutte le ricerche suesposte è che, non ostante la grande quantità di cadaveri seppelliti annualmente al Campo Verano, e nonostante che tale seppellimento non venga fatto dei singoli cadaveri isolatamente, come sarebbe il *desideratum* forse più del sentimento che dell'igiene, le condizioni del nostro cimitero, dal punto di vista della sanità pubblica, non lasciano nulla a desiderare.

Istituto d'Igiene della R. Università di Padova

Contributo allo studio sperimentale del potere disinfettante

DEI SAPONI COMUNI

PEL

Prof. Dott. A. SERAFINI

I.

Del potere disinfettante dei saponi comuni si sono finora più o meno specialmente e diffusamente occupati Koch (1881), Kuisl (1885), Di Mattei (1889), Behring (1890), Nijland (1893), Iolles (1893 e 1895), Reithoffer (1896) e Beyer (1896). A questi bisogna aggiungere Heyden, citato dal Beyer senza però speciale indicazione del rispettivo lavoro e dell'anno, in cui è stato fatto.

Koch riferisce, senza indicare però la necessaria condizione di tempo, di aver osservato che una soluzione di sapone potassico al 0,2 $^{0}/_{00}$ impediva lo sviluppo del bacillo del carbonchio, e che una soluzione al 1 $^{0}/_{00}$ lo annullava completamente.

Kuisl invece, che lavorò sotto la direzione di Buchner, trovò che a 37°C il vibrione del colera si sviluppava rigogliosamente perfino in soluzioni di sapone potassico al 50 $^{0}/_{00}$ e che neppure una soluzione al 100 $^{0}/_{00}$ era sufficiente a impedire la putrefazione della carne alla temperatura di camera o a quella di 37°C.

Di Mattei alla sua volta, adoperando specialmente saponi sodici, ebbe la morte del vibrione del colera, dei bacilli del tifo e del carbonchio e dello stafilococco piogene aureo nelle condizioni che riassumo nella tabella I. alla pagina seguente I risultati del tifo e del carbonchio, chiusi fra parentesi, sono stati ottenuti in esperienze, nelle quali, invece della cultura in brodo, Di Mattei adoperava culture in gelatina stemperate in acqua distillata.

Behring osservò che il bacillo del carbonchio moriva dopo 2 ore in brodi contenenti circa il 14 $^{0}/_{00}$ (cioè 1:70) di sapone sodico *(feste Waschseife)*, e che le spore di esso venivano annientate da una soluzione saponosa al 100 $^{0}/_{00}$ dopo 10 minuti alla temperatura di 80° - 83° C, dopo 15′ a quella di 77° C, dopo 20′ a quella di 75° C, e fra 30′ e 60′ alla temperatura di 70° C.

TABELLA I.

In 10 cc. di soluzione di sapone cultura in brodo circa cc.	SI È AVUTA LA MORTE DEI GERMI DOPO ORE				
	Con la soluzione di sapone al 25 °/₀₀	Con la soluzione di sapone al 100 °/₀₀			
	Colera	Colera	Tifo	Carbonchio	Stafilococco piogene
1/10	1	1/2	2 — (1/3)	(2)	24
1/4	1	1	6 — (2)	(18)	48
1/2	12	18	24 — (12)	(18)	72
1	18	18	48 — (24)	(192)	72
2	18	18	96 — (24)	(192)	120
4	24	—	—	—	—

La distruzione del vibrione del colera veniva invece ottenuta da Nijland dopo soli 15 minuti perfino con soluzioni di sapone dal 2,4 al 3 °/₀₀ in acqua comune, e anche con soluzioni al 1,8 °/₀₀ e appena dopo 5 minuti, se per le soluzioni adoperava acqua precedentemente sterilizzata con l'ebollizione.

Jolles, che ha adoperato pel colera 5 diversi saponi, nella loro azione disinfettante dimostratisi poco o niente aflatto differenti, e che pel tifo e pel *bacillus coli* s'è limitato solamente a un sapone potassico, aggiungendo 20 c.c. di cultura in brodo su 100 c c. delle soluzioni saponose (cioè 2 : 10), ha ottenuto la morte dei germi nelle condizioni di tempo, di temperatura e di concentrazione da me ricapitolati nella seguente tabella:

TABELLA II.

DURATA dell'azione delle soluzioni di sapone	TITOLO *PER MILLE* DELLE DIVERSE SOLUZIONI SAPONOSE che hanno agito sul										
	Colera					Tifo			B. coli comunis		
	15° C	30° C	40° C	45° C	50° C	4°-8° C	18° C	30° C	4°-8° C	18° C	30° C
1-2 minuti	80-100	90	50	7-8	3-5	—	—	—	—	—	—
10 »	30-40	50-60	9	2	—	—	—	—	—	—	—
15 »	—	—	—	—	—	60	80	90	—	100	100
30 »	10-20	40	5	2	—	60	60	80	80	80	90
1 ora	6-9	20-30	4	1	—	40	50	80	50	60	80
2 »	—	—	—	—	—	30	50	60	50	50	60
6 »	4-5	20	2	—	—	20	40	30	20	30	30
12 »	—	—	—	—	—	10	30	30	10	20	20
24 »	—	8-9	2	—	—	10	10	10	10	20	20

Sperimentando con tre diversi saponi, di cui uno conteneva il nitrobenzolo, Reithoffer alla sua volta ha visto che: α) le soluzioni al 100 °/₀₀ uccidevano in 1/2 minuto tutte le specie di vibrioni ch'erano a sua disposizione, β) le soluzioni al 20 °/₀₀ dopo 1 minuto, se fatte di sapone alla mandorla (contenente il 34 °/₀ di acqua) o di sapone potassico patentato (8,4 - 13 - 8 °/₀ di acqua), e fra 2 e 5 minuti se di sapone potassico commerciale (39 °/₀ di acqua); γ) le soluzioni al 10 °/₀₀ dopo 3-5 minuti annientavano i vibrioni di Massaua, e in 1/2 minuto quelli di altra provenienza; δ) le soluzioni al 5 °/₀₀ in 5 minuti distruggevano questi ultimi, mentre neppure in mezz'ora producevano la morte di tutti i vibrioni di Massaua, che solo dal sapone alla mandorla, contenente nitrobenzolo, venivano distrutti in 3 5 minuti; ε) e finalmente le soluzioni al 1 °/₀₀ non manifestavano nemmeno dopo 2 ore alcuna azione disinfettante.

Anche Reithoffer ha trovato che pel bacillo del tifo e, pel *B coli comunis* e pei piogeni il sapone è molto meno attivo, specialmente per questi ultimi, la cui morte non ha ottenuto neppure dopo un'ora con soluzioni al 180 - 200 °/₀₀.

E mentre Reithoffer crede che basti immergere per pochi minuti in soluzioni di sapone al 40 - 50 °/₀₀ biancherie e vestiti infetti di colera; Beyer, limitando le sue ricerche all' azione di diversi saponi economici, sciolti al 30 °/₀₀ in acqua comune, su biancherie sporche di fecce infette di vibrioni colerigeni, o di bacilli tifogeni o *coli*. ha ottenuto una vera disinfezione solo dopo 48 ore a temperatura fra 15° - 18° C, e dopo 24 ore a temperatura fra 3° - 5° C, ovvero quando manteneva le stoffe immerse prima per 1 - 3 ore in soluzioni riscaldate a 50° C e poi in soluzioni a temperatura di stanza. Dopo 24 ore otteneva la completa disinfezione anche a semplice temperatura di 15° - 18° C, allorchè le stoffe erano infettate solo con culture pure dei suddetti microrganismi. Le stoffe contenenti bacilli della difterite e stafilococchi piogeni non venivano disinfettate, nelle esperienze del Beyer, avanti le 48 ore, anche se tenute prima per 1 - 3 ore nelle soluzioni di sapone riscaldate a 50° C.

Heyden finalmente, come Beyer ne informa, è giunto al risultato che i saponi comuni non spiegano alcuna sicura azione disinfettante neppure in soluzioni al 50 °/₀₀.

Ho creduto bene di ridurre tutti i surriferiti risultati al rapporto *per mille*, a fine di far meglio rilevarne la reciproca contradizione, la quale è tale che non può non colpire vivamente chi del potere disinfettante dei saponi abbia occasione di occuparsi. E di essa da alcun tempo io già cercavo di rendermi ragione, allorquando comparve il lavoro del Reithoffer, che di tante notevoli contradizioni anche impressionato, si propose fra l'altro di studiarne la causa. Siccome egli però se n'è in realtà occupato meno di quanto l' introduzione del suo lavoro fa sperare, e crede doversi le notevoli differenze attribuire specialmente alla diversa resistenza che contro un disinfettante possono spiegare

razze diverse di uno stesso microrganismo, come, nelle sue ricerche, il vibrione del colera; così io ho creduto valesse la pena di continuare nelle indagini da me incominciate.

Dagli esperimenti del Reithoffer infatti risulta che la differenza dell'azione disinfettante del sapone su diverse razze di vibrioni colerigeni si manifesta solo a soluzioni relativamente deboli, cioè al 10 e al 5 °/₀₀; mentre, ammesso che i precedenti autori abbiano sperimentato con razze di vibrione del colera di differente resistenza, la divergenza fra i risultati di alcuni di essi appare per soluzioni molto più forti, cioè del 25 — 30 — 50 e perfino 100 per mille. Altre cause quindi, oltre la diversa resistenza dei germi, debbono aver contribuito a tanta contradizione di risultati; e di ricercare possibilmente la natura di esse ho creduto fosse importante così dal punto di vista teorico come e maggiormente da quello pratico.

II.

E innanzi tutto espongo i risultati alla mia volta ottenuti riguardo all'azione disinfettante di diversi saponi comuni; per lo studio della quale mi sono limitato al solo vibrione del colera, sia perchè esso è stato oggetto di ricerca della maggior parte dei precedenti sperimentatori, delle cui divergenze ho cercato di darmi ragione, sia perchè questi ultimi, che sono in tanto notevole disaccordo pei risultati dell'azione del sapone su un determinato microrganismo (per es. il v. del colera), sono invece in massima d'accordo nel dimostrare ch' essa è più efficace su un microrganismo che su un altro, più, per es., su quello del colera, che su quello del tifo, sul *b. coli comunis*, e sui piogeni.

Il vibrione da me adoperato è stato quello di Massaua, giacchè dei diversi vibrioni colerigeni a mia disposizione era desso che possedeva maggiore attività di sviluppo, sebbene fosse alquanto attenuato, occorrendo non meno di 5 c.c. di cultura in brodo di 24 ore per uccidere con iniezione peritoneale una cavia del peso di circa 400 grammi. Delle rispettive culture in brodo, tenute per 24 — 48 ore a 37° C e riconosciute pure prima di adoperarle, versavo 1 c.c. in 10 c c. della soluzione saponosa in esame; rimescolavo agitando con tutta cura ed esattezza; e quindi, trascorso un determinato tempo, prendevo del miscuglio la quantità, di cui erano capaci tre anse di platino di tre millimetri di diametro, e la trasportavo in tubi di brodo, che venivano poi lasciati per 4 giorni a 37° C. Che le tenue quantità di sapone, trasportato con le suddette anse nel brodo di cultura, non potevano in alcun modo impedire in esso lo sviluppo dei germi, risultava non

solo da ripetuti esperimenti di controllo, ma anche dal fatto ch'esso veniva in gran parte precipitato dai sali di calce nel brodo disciolti.

Le soluzioni saponose venivano fatte versando la necessaria quantità di sapone finamente grattugiato nell' acqua distillata o comune, a seconda i casi speciali della ricerca, contenuta in boccie a tappo smerigliato, le quali, previa una prolungata agitazione, venivano esposte per mezz'ora al vapore a 100°, sia per ottenere completa la soluzione del sapone, sia per assicurarne la sterilizzazione. Quindi si lasciavano per 24 ore alla temperatura nella quale voleva procedersi agli esperimenti.

I saponi adoperati sono di quelli che si trovano facilmente nel nostro commercio minuto. Tranne i due ultimi della seguente tabella alquanto teneri per la notevole prevalenza della potassa nella rispettiva composizione, onde l'alcalinità di essi è stata calcolata come ossido di potassio, gli altri erano tutti duri e quindi con prevalenza di soda; e all'analisi fatta coi rispettivi metodi comuni, [1] presentavano la seguente composizione *percentuale*:

---

[1] Il *contenuto d' acqua* è stato determinato dalla perdita di peso di 5 grammi di sapone finamente grattugiato, tenuto per 5 a 6 ore (fino a peso costante) nella stufa a secco fra 105° e 110°, e quindi nell'essicatore ad acido solforico

Le *sostanze insolubili nell'acqua* sono state rilevate dall'aumento di peso da un filtro tarato raggiunto dopo la filtrazione della soluzione calda di sapone seguita da sufficiente lavaggio con acqua distillata calda, e dopo essere stato pel tempo necersario nella stufa a 100° e quindi nell' essicatore ad acido solforico.

Gli *acidi grassi* e *l'alcalinità totale* si determinavano aggiungendo innanzi tutto alla soluzione calda e filtrata di 15 grammi di sapone in acqua distillata 50 c.c. di soluzione normale di acido solforico, e quindi 2 grammi di paraffina per favorire la solidificazione degli acidi grassi che rimangono liquidi alla temperatura dell'ambiente. Poscia, dopo aver mantenuto tutto per circa mezz'ora a bagno-maria, si lasciava raffreddare; e separata sia direttamente sia per mezzo di filtro tarato la parte solida, che veniva lavata con acqua distillata fino a completa scomparsa della reazione acida, la si teneva per qualche giorno nell'essicatore ad acido solforico, per poi pesarla e, detratti i 2 grammi di paraffina aggiunti, calcolarla come acidi grassi *idrati*. che si riducono ad acidi grassi *anidri* sottraendo il 3,25 %. La parte liquida poi e le acque di lavaggio si raccoglievano in bottiglia tarata, e portato tutto a un determinato volume, se ne determinava su una parte aliquota l'acidità per mezzo di una soluzione decinormale di soda. Moltiplicando la parte dei 50 c.c. di acido solforico normale, che così risultava neutralizzata dall' alcali di sapone, per 0,047 ovvero per 0,031, a seconda che si voleva calcolare come ossido di potassio (K 0), nel caso di saponi teneri, ovvero come ossido di sodio ($Na_2 0$), nel caso di saponi duri, si aveva l'alcalinità totale del sapone analizzato.

Le *sostanze solubili in acqua* si calcolavano in ultimo, *per differenza*, dopo le precedenti analisi.

TABELLA III.

QUALITÀ DEI SAPONI	Acqua	Acidi grassi anidri	Alcalinità totale	Sostanze insolubili in acqua	Sostanze solubili in acqua
I - bianco uso Marsiglia . .	22.0	62.5	9.2	1.8	4.6
II - grigio-verdastro	9.6	54.8	6.0	29.8	—
III - marmorato-rosso. . . .	14.9	67.7	8.5	7.6	1.3
IV - marmorato-rosso. . . .	32.5	56.4	7.3	4.2	—
V - da toletta non profumato cinereo	12.1	78.4	9.4	—	—
VI - verde	7.8	64.5	7.8	18.6	2.8
VII - marmorato-azzurro . . .	28.8	65.1	7.8	3.8	—
VIII - bruno e tenero	26.5	65.3	7.6	0.9	—
IX - grigio e tenero	20.4	68.2	9.7	—	1.7

I risultati ottenuti in ripetute prove sono riassunte nella seguente tabella, nella quale è segnato in ore e in minuti il tempo necessario per aversi, in rapporto al vibrione del colera adoperato (Massaua), una sicura disinfezione con ciascuna delle indicate soluzioni dei precedenti saponi in acqua distillata; e tali risultati sono quelli ottenuti specialmente a temperatura al disotto di 15° C e per la massima parte al di sopra di 10° C. Lo zero vuol dire che non si è avuto azione disinfettante neppure nello spazio di 48 ore.

TABELLA IV.

Saponi corrispondenti a quelli della precedente tabella	SOLUZIONI DI SAPONE											
	1 ‰		2,5 ‰		5 ‰		7,5 ‰		10 ‰		50 ‰	
	Ore	Minuti	Ore	Minuti	Ore	Minuti	Ore	Minuti	Ore	Minuti	Ore	Minuti
I	0	—	3	—	$1\,^1/_4$	—	—	15	—	10	—	5
II	0	—	5	—	2	—	—	20	—	10	—	5
III	0	—	2	—	1	—	—	10	—	8	—	3
IV	0	—	$4\,^1/_2$	—	$1\,^1/_2$	—	—	15	—	10	—	5
V	20	—	$1\,^1/_2$	—	—	30	—	8	—	5	—	1
VI	0	—	6	—	3	—	$1\,^1/_4$	—	—	45	—	5-8
VII	0	—	3	—	$1\,^1/_4$	—	—	15	—	10	—	5
VIII	0	—	8	—	4	—	2	—	$1\,^1/_2$	—	—	15
IX	0	—	2	—	—	45	—	10	—	5	—	3

Se si tien conto però che io sperimentavo aggiungendo a 10 c.c. di soluzione di sapone 1 c.c. di cultura in brodo, le rispettive proporzioni di questa tabella si riducono realmente a 0,909 — 2,272 — 4,545 — 6,818 — 9,09 — e 45,454 *per mille*, senza considerare quella parte di sapone che precipitava pei sali terrosi contenuti nel brodo, e che perciò faceva anche maggiormente diminuire il titolo reale delle soluzioni di sapone in contatto col vibrione di Massaua.

Ora anche nei risultati delle mie ricerche si notano certamente fra alcuni saponi notevoli differenze, le quali, se non sono dell'entità delle più colossali dei precedenti autori, si aggirano in ogni modo quasi nei limiti delle differenze minori e più frequenti dei risultati altrui.

Tuttavia, nonostante tali differenze, non si può non riconoscere che i saponi comuni possiedono un notevole potere disinfettante, una volta che, per esempio, la soluzione al 10 ‰ uccide il vibrione colerigeno in pochi minuti, presso a poco come una eguale soluzione di acido fenico.

E bisogna per conseguenza conoscere innanzi tutto a che cosa specialmente si debba il potere disinfettante dei saponi, per vedere quindi di trovare la causa delle piu o meno notevoli differenze fra l'azione di diversi saponi, le quali sono per la pratica tutt' altro che indifferenti.

III.

Dopo l'affermazione del Behring che il potere disinfettante del sapone dipende solo dal contenuto di alcali, si è ritenuto dai più e si è facilmente ripetuto che « le esperienze di laboratorio hanno dimostrato che, affinchè l'alcali dei saponi agisca da vero disinfettante, deve essere in soluzione concentrata, e la sua azione debba durare alcune ore. »

Ora, non potendosi con questo naturalmente intendere il contenuto d'alcali combinato cogli acidi grassi come sapone neutro, ho creduto di portare innanzi tutto la mia attenzione sull'*alcalinità libera delle soluzioni* di sapone e non limitarmi. come alcuni dei precededti autori, all'*alcalinità del sapone stesso*, sia perchè, agendo nella disinfezione il sapone sciolto in acqua, bisogna tener conto della parziale decomposizione che il sapone nell'acqua subisce, per cui si mette in libertà una quantità di alcali maggiore di quella indicata, allorchè esiste, dall'alcalinità libera del sapone adoperato; sia perchè questa è tale che non potrebbe, in alcun modo, spiegare indipendentemente l'azione disinfettante dei saponi.

Infatti nei saponi esaminati da Jolles essa oscilla fra un massimo di 0,065 per cento e un minimo di 0,004 per cento, e in quelli di Beyer fra un massimo di 0,0963 e un minimo di tracce indeterminabili; e mentre mancava nel sapone V dei miei esperimenti (cioè il più energico), essa era presente nel sapone VIII (il meno attivo). Avendola inoltre determinata nel sapone I col metodo di Gräger [1], essa raggiungeva appena il 0,08 per cento, cosicchè perfino nella soluzione di tale sapone al 50‰ raggiungeva appena il rapporto del 0,04 ‰, ciò che non poteva spiegare affatto la notata azione disinfettante. Quindi non è all'alcalinità *libera* del sapone che si deve attribuire il loro potere di disinfezione.

Per determinare l'alcalinità che *si libera* nella soluzione di sapone in acqua, mi son servito della soluzione $\frac{N}{10}$ e $\frac{N}{100}$ di acido ossalico, a seconda che la determinazione doveva aver luogo in soluzioni di sapone dal 5 ‰ in giù o dal 7.5 ‰ in su. Tali soluzioni di acido ossalico venivano versate fino a scomparsa della reazione alcalina su 10 cc. di soluzione di sapone aggiunta di fenolftaleina. E che in tali condizioni l'acido ossalico neutralizzi appunto l'alcalinità libera nelle soluzioni prima di produrre nel sapone altra scomposizione, lo dimostra il fatto che, se a una soluzione di sapone così neutralizzato si aggiunge una determinata quantità di soluzione normale di soda, per neutralizzare la nuova alcalinità che nella soluzione saponosa ne deriva, occorre precisamente l'equivalente quantità della soluzione titolata dell'acido suddetto.

Così determinata adunque l'alcalinità *libera nelle diverse soluzioni* di sapone in acqua a temperatura ordinaria, ho trovato che, espressa come soda caustica, a fine di poterla paragonare con alcuni dati del Kitasato [2], essa ha oscillato:

---

[1] Tale metodo consiste: α) nel precipitare da una soluzione acquosa calda di sapone al 20 per cento il sapone neutro, aggiungendovi del cloruro di sodio purissimo fino a completa saturazione; β) nel filtrare e lavare il precipitato con soluzione satura a freddo di cloruro di sodio fino a scomparsa della reazione alcalina; γ) e infine nel determinare, con una soluzione acida normale, l'alcalinità del filtrato e delle acque di lavaggio raccolti insieme in una boccia tarata e portati con l'aggiunta di acqua distillata a un determinato volume.

Col versare senz'altro alcune gocce di soluzione alcoolica di fenolftaleina sul taglio recente di un pezzo di sapone, si può venire a conoscere semplicemente se si è in presenza di alcalinità libera.

[2] *Ueber das Verhalten der Typhus-und Cholera bacillen zu säure-und alkalihaltigen Nährböden.* Zeitschrift für Hygiene, Band III, pag. 404, 1887.

Volendosi tale alcalinità libera espressa invece come ossido di sodio (Na_2O) nella stessa guisa dell'alcalinità totale delle tabella III, basta moltiplicarne i dati pel fattore 0775.

Per le soluzioni	al	2.5 ‰	fra	0.074	e	0.086 ‰
»	»	al 5 ‰	fra	0.168	e	0.232 ‰
»	»	al 7.5 ‰	fra	0. 22	e	0. 38 ‰
»	»	al 10 ‰	fra	0. 30	e	0. 46 ‰
»	«	al 50 ‰	fra	1. 40	e	1. 92 ‰

Ora, secondo le ricerche del Kitasato, tale contenuto di idrato di sodio libero non può spiegare la notata azione disinfettante dei rispettivi saponi, neppure nelle soluzioni al 50 ‰, una volta che per ottenere sicuramente la morte del vibrione del colera *dopo 4-5 ore* egli ha trovato necessario non meno del 2.37 ‰ di soda o di potassa caustica. Secondo i dati del Kitasato, la proporzione con cui l'alcali libero si trova nella soluzione di sapone al 50 ‰ sarebbe appena sufficiente a impedire lo sviluppo del germe, ma non a causarne la morte, specialmente con quella rapidità con cui abbiam visto che il sapone in tale proporzione la produce.

Nelle prove di controllo però da me fatte preparando della soluzione di soda in acqua distillata (laddove Kitasato aggiungeva invece l'alcali nei terreni nutritivi), secondo le proporzioni con le quali essa appariva libera nelle diverse soluzioni di sapone studiate, risultava che se quelle corrispondenti alle soluzioni di sapone 2.5, 5, 7.5 e 10 per mille non giungevano a produrre la morte del vibrione neppure dopo 48 ore, quelle invece corrispondenti alla soluzione 50 ‰ lo annientavano nello spazio di 30-40 minuti, in un tempo, cioè, reletivamente *molto più lungo* di quello necessario per la corrispondente soluzione di sapone.

Non potendo quindi parlarsi dell'*alcali combinato* cogli acidi grassi come sapone neutro, nè dell'*alcalinità libera* del sapone, e non mostrandosi capace di produrre la morte del vibrione del colera quell'*alcalinità che diviene libera* in quelle soluzioni di sapone che la morte del vibrione cagionano, non si può all'alcalinità, o per lo meno solo all'alcalinità, attribuire il potere disinfettante dei saponi.

E infatti, se si elimina l'alcalinità libera delle soluzioni di sapone, neutralizzandola con una soluzione di acido ossalico convenientemente concentrata per evitare che l'acqua ch'essa viene ad aggiungere alle soluzioni saponose ne alteri in modo sensibile il titolo, si ha che mentre per le soluzioni deboli di sapone ne segue solo un affievolimento del potere disinfettante, per quelle forti questo non subisce alcun mutamento. Così mentre delle soluzioni al 10 e al 50 ‰ del sapone I neutralizzato non è diminuito che pochissimo o nulla il potere disinfettante, la soluzione al 5 ‰, che uccideva il Massaua dopo un'ora e un quarto, neutralizzata spiegava invece la stessa efficacia dopo 15 ore, e la soluzione al

7.5 $^{0}/_{00}$ che spiegava la sua azione popo 15 minuti, neutralizzata manifestava lo stesso effetto dopo 35 minuti.

Cosicchè la rispettiva alcalinità libera, per sè affatto insufficiente a spiegare una qualsiasi azione disinfettante sul vibrione del colera, aumenta l'azione delle soluzioni acquose deboli di sapone, e relativamente tanto più l'aumenta quanto più basso è il titolo di esse. E che nelle soluzioni deboli questo aumento realmente si verifica, lo dimostra anche il fatto che se della soluzione al 5 $^{0}/_{00}$ si raddoppia con l'aggiunta di soda la alcalinità libera, il tempo necessario per una sicura disinfezione si accorcia da un'ora e un quarto a 20 minuti, sebbene tutta l'alcalinità libera, risultante dopo tale aggiunta, sia per sè stessa insufficiente a produrre anche dopo 48 ore la morte del vibrione del colera. Da una parte, però, il persistere inalterato del potere disinfettante delle soluzioni alquanto forti, anche dopo la loro neutralizzazione, e dall'altra l'essere indebolito ma non annientato quello delle soluzioni deboli neutralizzate, dimostrano che se, specialmente nel caso di queste ultime, l'alcalinità che si libera nelle soluzioni di sapone in acqua fredda può coadiuvare l'azione disinfettante del sapone, questo in ogni modo possiede un potere disinfettante proprio, che, dalle soluzioni del 10 $^{0}/_{00}$ in sopra, si manifesta notevolmente energico anche senza il concorso di tale alcalinità.

Ora per la parziale decomposizione dei saponi in soluzioni acquose risultano, secondo alcuni, fra i quali primo Chevreul, saponi acidi insolubili e alcali libero disciolto, e secondo altri invece, fra i quali Rotondi, saponi acidi insolubili e saponi basici solubili. Come che sia, però, nelle soluzioni di sapone in acqua vi ha una parte non disciolta e l'altra disciolta, e quindi riesce interessante il sapere a quale di esse specialmente l'azione disinfettante del sapone si debba attribuire.

A tale scopo, limitando le mie ricerche al sapone I, non premendomi evidentemente per questa parte dei miei quesiti di estenderle a tutti o a parecchi degli altri saponi, ho saggiato l'azione che spiegavano sul vibrione del colera le soluzioni 5 $^{0}/_{00}$ e 10 $^{0}/_{00}$ *non filtrate* e *filtrate*. Per quanto sia difficile raggiungere una buona filtrazione delle soluzioni acquose fredde di sapone, che non attraversano il filtro mai veramente limpide, pure io, sull'esempio anche del Rotondi, mi sono di essa con le maggiori cautele avvalso per separare la parte sciolta dalla insolubile.

E siccome il potere disinfettante della soluzione di sapone non è *prima* della filtrazione maggiore che *dopo*, così è alla parte disciolta e che attraversa il filtro che tale potere bisogna attribuire.

Ora da una parte corrispondendo l'alcalinità *libera* del filtrato so-

lamente in media al 30 % dell'alcalinità totale di esso, e d'altra parte risultando per l'aggiunta di acidi minerali esservi nel filtrato sempre del sapone, è da ritenersi che attraversano il filtro o saponi basici, ovvero con alcali libero anche saponi neutri, essendo i saponi acidi insolubili. In ogni modo, se si neutràlizza l'alcalinità libera del filtrato, si ha un liquido che si conserva neutro per molte ore o costantemente (a seconda della maggiore o minore concentrazione della soluzione), e che contiene certamente del sapone disciolto, giacchè, passato alla sua volta per filtro, il relativo filtrato di *reazione neutra* svela all'aggiunta di acidi minerali la presenza del sapone, e per l'aggiunta di nuova acqua riacquista la reazione alcalina.

Ciò vuol dire che sia libera l'alcalinità del filtrato prima della rispettiva neutralizzazione, o sia dovuta a saponi basici, il filtrato in ogni caso contiene, dopo la neutralizzazione, saponi neutri disciolti. E siccome il potere disinfettante del filtrato neutralizzató è lo stesso di quello della rispettiva soluzione di sapone prima della filtrazione (a meno che non si abbia a fare con soluzioni di basso titolo, come innanzi è dimostrato), così si deve riconoscere ai saponi neutri, cioè ai sali neutri sodici o potassici degli acidi grassi, che costituiscono i saponi propriamente detti, un potere disinfettante che, senza necessaria contribuzione dell'alcalinità libera della soluzione, si dimostra notevole anche in soluzioni di titolo non molto elevato, per esempio al 10 ‰. La qual cosa veniva accennata fino dal 1881 anche da Koch, quando riconosceva che il sapone potassico cominciava a manifestare, nei suoi esperimenti, un potere disinfettante in proporzione otto volte inferiore a quello della potassa, sebbene però egli credesse doversi ciò agli acidi grassi; la qual cosa non mi sembra invero giusta, perchè questi, se combinati con gli alcali come sapone, non possono più agire come acidi grassi, e se liberi, non sono solubili in acqua.

IV.

Stabilito in tal modo che al sapone propriamente si deve il potere disinfettante delle sue soluzioni in acqua, come vanno spiegati tanto i discordi risultati dei precedenti sperimentatori quanto i miei?

Non è da pensare che alle differenze dei precedenti autori per soluzioni dello stesso titolo o di titoli molto prossimi debba aver contribuito, nel modo come ho detto ch'essa contribuisce per soluzioni tenui, quell'alcalinità che nelle soluzioni acquose di sapone si libera, prima di tutto perchè tali differenze risultano anche per soluzioni a titolo

elevato, e poi perchè le oscillazioni dell'alcalinità libera nelle soluzioni di titolo eguale non possono essere tali da giustificare così notevoli disparità di risultati.

Nè queste possono attribuirsi all'essere potassico o sodico il sapone adoperato, perchè così dalle mie come dalle altrui esperienze non risulta che la diversità della base alcalina dei saponi contribuisca a questi un diverso potere disinfettante.

Quindi a ben altro si devono quelle stridenti differenze attribuire.

E innanzitutto bisogna tener calcolo del *solvente*, giacchè i solventi che contengono calce o magnesia, come l'acqua comune e il brodo, non possono non alterare più o meno notevolmente il titolo della soluzione saponosa, dando luogo agl'insolubili saponi di tali terre alcaline. Ora parecchi dei precedenti autori, come Koch, Kuisl, Nijland, Beyer, si sono serviti nelle loro ricerche appunto di tali solventi, o sciogliendo i saponi in acqua comune, ovvero versandovi le soluzioni già fatte in acqua distillata. E se ciò non può darci intera ragione dei risultati più o meno sfavorevoli ottenuti con soluzioni al 30, al 50 e al 100 °/₀₀, perchè essendo necessario in cifra rotonda gr. 0,1 di sapone per ogni grado di durezza francese, vi resterebbe sempre nelle soluzioni a titolo così elevato tanto di sapone disciolto da poter spiegare i buoni risultati da altri notati, certo può darci invece in parte o in tutto ragione delle differenze del potere disinfettante di soluzioni di titolo piuttosto basso. Infatti, mentre nessuna differenza ho notato nel potere disinfettante di soluzioni forti del sapone I in acqua distillata e nell'acqua dell'acquedotto di Padova, la cui durezza risultava nel momento dell'analisi di 23 gradi francesi, l'ho notata invece in quello delle soluzioni al 2.5 e 5 °/₀₀. Mentre invero la soluzione al 2.5 °/₀₀ in acqua distillata uccideva il vibrione di Massaua in tre ore, la stessa soluzione in acqua dell'acquedotto di Padova non spiegava alcuna azione disinfettante neppure dopo 48 ore; e mentre la soluzione al 5 °/₀₀ se fatta in acqua distillata uccideva tale vibrione in un'ora e un quarto, l'uccideva invece dopo otto ore, se fatta nell'acqua dell'acquedotto, tempo che si accorciava fino a tre ore e mezzo, se la soluzione veniva invece fatta nella stessa acqua bollita, la cui durezza permanente si riduceva a 6 gradi francesi.

Ed è appunto considerando questi fatti che, mentre si trova un fattore che ha potuto contribuire ai risultati sfavorevoli di Kuisl e di Beyer e ha alquanto diminuita l'azione disinfettante al 14 °/₀₀ circa, fatta da Behring nel brodo, non si possono trovare che addirittura meravigliosi così i risultati ottenuti da Koch, sul carbonchio con una soluzione al 1 °/₀₀ di un sapone potassico d'ignota composizione, fatta nel brodo, che pel suo contenuto di calce e di magnesia ha dovuto in parte

precipitare il sapone aggiunto, come e maggiormente i risultati del Nijland, che otteneva dopo 15 minuti la morte del vibrione colerigeno con soluzione di sapone al 2.4 e al 3 °|₀₀ nell'acqua dell'acquedotto di Amsterdam (acqua del Vecht filtrata) che ha una durezza totale oscillante fra 19.2 e 27.6 gradi francesi [1]. Forse pel Nijland è intervenuto in modo potente la proprietà dell'acqua del Vecht, notata dal Forster e dal van Hest, cioè che i vibrioni del colera muoiono in gran parte in essa dopo un sol quarto d'ora; altrimenti non si potrebbe spiegare tale efficacissima azione di soluzioni di sapone, dalle quali pei sali di calce e di magnesia il sapone è tutto o quasi tutto precipitato.

In ogni modo, siccome nella pratica della disinfezione, specie per le circostanze in cui si ricorre al sapone, è appunto dell'acqua comune che bisogna certamente far uso, così occorre tener calcolo della rispettiva durezza e sciogliere in essa tanti decigrammi di sapone in più di quello che per la disinfezione è ritenuto necessario, quanti sono i gradi francesi della durezza dell'acqua; a meno che, come innanzi ho notato, non si facciano, come del resto si consiglia, soluzioni a titolo elevato. E non è a fidarsi di quello che ho sentito anche essere consigliato, cioè di sciogliere nell'acqua tanto sapone fino ad avere una spuma persistente e abbondante, perchè ciò può facilmente indurre in errore, una volta che in acqua non contenente più sali di magnesia e di calce si ha tale spuma anche nelle proporzioni del 0.15-0.2 di sapone per mille.

Inoltre bisogna anche ricordare che l'acido carbonico, che trovasi disciolto o semicombinato nell'acqua, o che con la soluzione di sapone può venire in diretto contatto, rende i saponi insolubili in acqua; e quindi se si pone in un termostato a 37° una soluzione di sapone in acqua o in brodo contenuta in recipienti non ermeticamente chiusi, ma solo tappati con ovatta, ovvero coperti da una coppa di vetro come è il caso delle capsule del Petri, l'acido carbonico, che nell'aria di tali termostati è, per varie ragioni, sempre abbondante, fa precipitare gran parte del sapone disciolto, e per conseguenza altera il titolo delle rispettive soluzioni e toglie loro il relativo valore disinfettante. Infatti, se si mette in tali condizioni una soluzione di sapone relativamente limpida, si trova dopo alcun tempo divenuta notevolmente lattiginosa. E quindi anche questo fatto ha dovuto certo contribuire a scemare il potere disinfettante del sapone negli esperimenti di Kuisl e di Beyer, quando ponevano nel termostato a 37° C le rispettive soluzioni di sapone in brodo o in acqua comune; e questo fatto certo darà ra-

[1] *Verslag van de Werkzaamheden van den Gemeentelijken Gezondheidsdienst in de Gemeente Amsterdam over 1895.*

gione di alcune differenze fra i miei risultati e quelli di Iolles circa l'azione della temperatura sul potere disinfettante delle soluzioni acquose di sapone.

Durante i miei esperimenti ho notato che, per le soluzioni a titolo non molto elevato (specie al disotto del 10 °|₀₀) si aveva con l'aumento della temperatura un aumento del rispettivo potere disinfettante, ciò che, come è noto, si avvera per tutte le sostanze antimicrobiche adoperate in dosi non semplicemente antisettiche, ma veramente disinfettanti.

Questo si avverava però pei saponi addirittura con differenze di temperatura non molto notevoli. Così la soluzione 5 °/₀₀ del sapone I, che alla temperatura di 10°-12° C. uccideva il vibrione di Massaua nello spazio di ore 1 $^1/_4$, lo uccideva invece fra 30 e 45 minuti alla temperatura di 18°-20° C. E avendo esposto, nelle ripetute esperienze su questa azione della temperatura, le soluzioni di sapone oltre che alla temperatura di laboratorio, oscillante fra 18° e 20°, anche nella ghiacciaia e, chiuse in boccie con tappo a smeriglio, nel termostato a 37°-40°; ho potuto vedere che la differenza dell'azione disinfettante era maggiore fra le soluzioni esposte a 10°-12° C e quelle mantenute a 18°-20° C, che non fra queste ultime e quelle poste nel termostato. Ora siccome ho innanzi dimostrato che il potere disinfettante delle soluzioni di sapone in acqua si deve alla parte di questo che si scioglie, così ho creduto bene vedere come sulla solubilità dei saponi le suddette temperature influiscano.

E a tale scopo, dopo aver fatto sciogliere il sapone in acqua calda, lasciavo per 24 ore le rispettive soluzioni alla temperatura di cui volevo studiare l'azione, alla quale temperatura stessa poi ne filtravo 25 cc., di cui pesavo il residuo ottenuto a 105° C.

Ecco il risultato medio di parecchie ricerche:

TABELLA V.

Temperatura in Celsius	Rapporto percentuale del sapone disciolto nelle soluzioni					
	2,5 °|₀₀	5 °|₀₀	10 °|₀₀	20 °|₀₀	30 °|₀₀	40 °|₀₀
10-12	90	88	87	81	80	77
18-20	100	99	99	98	96	94
37-40	100	100	100	100	100	100

Sulla quantità di sapone disciolto influisce dunque la temperatura, in quantochè se ne scioglie più a 18°-20° che a 10°-12°, e più a 37°-40° che a 18°-20°; con questo che a 37°-40° (almeno per le soluzioni suindicate, e perchè i saponi acidi, che sono insolubili anche in acqua bollente, vengono però sciolti dai saponi basici a caldo) si scioglie tutto, e che la proporzione di sapone sciolto a 18°-20° si discosta da quelle a 10°-12° molto più che da quella a 37°-40°. E inoltre la proporzione di sapone sciolto è maggiore quanto minore è la concentrazione della soluzione.

Ora, non solo nel fatto in massima ben noto dell'influenza favorevole della temperatura sui veri disinfettanti, ma anche in questa azione della temperatura sulla solubilità dei saponi in acqua si trova certo la ragione della differenza notata nel potere disinfettante di alcune soluzioni del medesimo titolo, lasciate a temperatura anche di pochi centigradi fra loro differenti. E ciò può aver anche contribuito alle differenze che per soluzioni a titolo non molto elevato si notano fra i risultati di diversi sperimentatori, i quali facendo le loro ricerche a temperatura di laboratorio, si sono potuti facilmente appunto trovare in condizioni di temperatura di pochi centigradi fra loro differenti.

E se le ricerche di Jolles (i cui risultati sono del resto ai miei più degli altri vicini, sebbene egli abbia aggiunto nelle soluzioni di sapone le culture in brodo del vibrione colerigeno nella proporzione del 20 %, mentre io le ho aggiunte in quelle del 10 %), e se, dico, le ricerche di Jolles fatte alla temperatura di 30° C, contradicono alle mie, sembrando, secondo i risultati di esse, che a tale temperatura l'azione disinfettante delle soluzioni di sapone, specie a titolo basso, diminuisca; ciò si deve certo all'azione dell'acido carbonico dell'aria del termostato su tali soluzioni. Infatti mentre nelle ricerche sul colera è relativamente notevole tale diminuzione quando si passa dalla temperatura di 15° (*fuori termostato*) a quella di 30° (*nel termostato*), nelle ricerche sul tifo e sul B. coli essa risulta molto minore, allorchè si passa alla temperatura di 30° da quella di 18°, *anche nella quale le soluzioni infettate venivano tenute in un rispettivo termostato.*

Tutte queste condizioni però, che possono contribuire a spiegare alcuni dei discordi risultati dei precedenti autori, non hanno certo influito sui miei risultati esposti nella tabella IV; tuttavia si rilevano in essa delle disparità abbastanza notevoli, come per es. fra il sapone V e il IV, per non parlare del VI e del VIII. Ora, non potendosi far calcolo sull'alcalinità *libera* dei rispettivi saponi nè su quella che *si libera* nelle soluzioni di essi in acqua, occorre vedere se l'azione disinfettante corrisponde al maggiore o minore contenuto di acqua e di so-

stanze estranee nel sapone adoperato, come ciò che, diminuendo nei pezzi commerciali il reale contenuto di vero sapone, cui propriamente si deve, come abbiam visto, il potere disinfettante, viene ad alterare il vero titolo della rispettiva soluzione. Ciò realmente risulta dai miei esperimenti, come si può vedere se si consulta la tabella IV, avendo presente che la somma delle *sostanze estranee* e *dell'acqua* su 100 parti dei rispettivi saponi è la seguente:

Sapone	I.	28,4
»	II.	39,4
»	III.	23,8
»	IV.	36,7
»	V.	12,1
»	VI.	29,2
»	VII.	27,6
»	VIII.	27,4
»	IX.	22,1

E questo viene tanto più confermato dal fatto che, avendo eseguito due volte le ricerche col sapone III, una cioè quando presentava la composizione riferita nella tabella III, e un'altra, sei mesi prima, allorchè era tenero (tanto che alla persona, che mandai a comperarlo, fu venduto per sapone potassico) e aveva un contenuto d'acqua del 45,8 %, che con le rispettive sostanze estranee rappresentava il 51,4 % di tutto il pezzo, il potere disinfettante del sapone era in questo secondo caso tanto minore di quello rispettivo riferito nella tabella V, che con la soluzione al 2,5 ‰ non si aveva alcuna azione disinfettante neppure dopo 24 ore, e con la soluzione al 7,5 ‰ si aveva solo dopo 2 ore e mezzo.

Siccome però col contenuto di acqua e di sostanze estranee non si trova d'accordo il debole potere disinfettante dei saponi VI e VIII, io ho creduto procedere oltre nell'indagine; e messo in guardia specialmente dal loro colore, ho pensato di esaminare i miei saponi anche dal punto di vista del contenuto di resina. [1]

---

[1] Ho adottato il metodo di Gladding con le modificazioni di Hübl e Städler, metodo che si fonda sulle grande solubilità dei resinati di argento nell'etere, nel quale sono invece insolubili i sali d'argento degli acidi grassi. Mezzo gramma della massa che, in seguito all'aggiunta di acido cloridrico, si separa dalla soluzione acquosa di sapone, e che si suole in genere calcolare tutta come acidi grassi, si scioglie a bagno-maria in 20 cc. di alcool a 90-95; e tale soluzione neutralizzata con potassa, indicatore la fenolftaleina,

Allo scopo di renderli non solo più economici, ma anche più schiumosi, più detersivi e atti al lavaggio anche con acqua salata, vengono spesso aggiunte ai saponi le resine (specie la colofonia), perchè, decomposte dagli alcalini, danno luogo ai rispettivi resinati detti *saponi di resina*, i quali sono decomposti dagli acidi minerali come i saponi veri. Tuttavia essi non possono essere considerati come veri saponi, nei quali gli acidi, che intervengono alla formazione del sale, sono tanto differenti dall'acido derivante dalla decomposizione delle resine; e quindi ben possono non avere quel potere disinfettante che abbiamo visto essere proprio di quelli.

E infatti, mentre tutti gli altri saponi ne erano privi, il sapone VI conteneva la resina nella proporzione del 15 per cento della massa separantesi nell'analisi come acidi grassi, e l'VIII in quella del 36 per cento.

Ora, oltre alle altre condizioni innanzi discusse, è appunto questa naturale influenza del contenuto di acqua e di sostanze estranee o dei saponi di resina quella, a cui con la massima probabilità si devono sopratutto i risultati più o meno notevolmente sfavorevoli del Kuisl, del Heyden, dei cui saponi potassici è del tutto ignota la composizione, del Beyer, che ha adoperato saponi che, dalle poche notizie che ne dà, o si dimostrano certamente impuri, o sulla loro purità destano forte dubbio, e del Di Mattei, che dei saponi adoperati si limita a riferire la composizione quale dai fabbricanti gli è stata indicata.

Nei risultati di quest'ultimo autore poi si nota inoltre un altro fatto abbastanza considerevole, giacchè, come dai suoi dati riferiti nella tabella I si rileva, egli ottiene che, per esempio sul vibrione del colera, l'azione disinfettante della soluzione al 25 $^0/_{00}$ è quasi sempre eguale a quella della soluzione al 100 $^0/_{00}$, anzi una volta appare perfino superiore. Ora è molto difficile a spiegare perchè non aumenti di efficacia

---

si porta tutta in un bicchiere a precipitato, diluendola con acqua distillata fino a circa 200 cc. Quindi, operando per maggiore precauzione in camera oscura, si aggiunge della soluzione di nitrato d'argento fino a che non si ha più precipitato; si filtra, e si lava il precipitato raccolto sul filtro, che poi si essicca prima a bagno-maria e infine nella stufa a 100°. Poscia, per mezzo dell apparecchio di Soxhlet, si estraggono con l'etere i resinati; e la risultante soluzione eterea filtrata si agita, con acido cloridrico 1: 3, in un imbuto a rubinetto, per far precipitare l'argento dei rispettivi resinati. Separata infine dall'acido cloridrico la soluzione eterea, si filtra di nuovo, e si svapora in capsula tarata, per pesarne in ultimo il residuo, che rappresenta appunto la resina nel mezzo gramma della suddetta massa. Con una semplice proporzione se ne calcola infine la percentualità.

una soluzione di quadrupla concentrazione di una sostanza che possiede certamente un potere disinfettante; ed è possibile (non affermo che ciò sia certamente avvenuto) che, mettendo il Di Mattei « nell'acqua sterilizzata dei pezzetti di sapone che enucleava dal centro di masse grosse », tali pezzetti non si siano, nelle soluzioni concentrate, del tutto disciolti ma che, mascherati dall'aspetto torbido e dalla consistenza sciropposa della soluzione, siano rimasti nel fondo del rispettivo pallone di vetro, dove, circondati da acqua di sapone già ricca, difficilmente potevano disciogliersi, anche dopo molto tempo, a temperatura ordinaria. Infatti, avendo io posto in acqua distillata, nella proporzione del 100 °/₀₀, dei pezzetti di sapone della grandezza di circa 1 c. c. al massimo, non ne ho ottenuto la completa soluzione neppure dopo una settimana, non ostante che la boccia, che li conteneva, venisse di frequente agitata, e tanto meno allorchè invece dell'acqua distillata ho adoperato l'acqua comune magari bollita.

V.

Cosicchè l'azione del solvente, dell'acido carbonico e della temperatura, il diverso contenuto di acqua e di sostanze estranee nei saponi, e la presenza di saponi di resina, oltre alla diversa resistenza di razze diverse di uno stesso microrganismo, dal Riethoffer messa in luce, danno sufficiente ragione dei discordi risultati finora ottenuti; e tutto ciò spiega anche le differenze che si sono avute da coloro (Di Mattei, Jolles, Boyer) che hanno pure sperimentato mettendo nelle soluzioni acquose di sapone dei pezzi di stoffa infettati con microrganismi patogeni. Ma ai risultati poco favorevoli altri fatti in quest'ultimo caso, secondo me, concorrono; giacchè anche a me è toccato notare sulle tele, infette di vibrioni di Massaua, molto minore l'azione disinfettante delle stesse soluzioni, che nelle precedenti esperienze si erano dimostrate abbastanza efficaci.

Immergendo infatti in soluzioni di sapone, contenute in grandi cristallizzatori, pezzi di tela prima sterilizzati e poi immersi per alcuni minuti nelle culture di brodo del Massaua, ho visto che la soluzione 5 °/₀₀ del sapone I non spiegava con certezza la sua azione disinfettante se non dopo 10 ore, e la soluzione 10 °/₀₀ dopo 24 ore; mentre nelle precedenti mie ricerche la soluzione 5 °/₀₀ si mostrava efficace dopo ore 1 $^{1}/_{4}$ e quella 10 °/₀₀ dopo 15 minuti.

Io credo che ciò dipenda dalla difficoltà che la più o meno densa soluzione di sapone incontra nel ben compenetrare ogni parte delle tele

infette, specie quando pori e le superficie di esse sono occupate da altri liquidi, che come il brodo possono provocare importanti alterazioni del sapone, o quando siano ricoperte da materiale più o meno ricco di sostanze difficilmente nel sapone solubili, come le sostanze albuminoidi. E infatti, producendo la disinfezione ben 15 ore prima, la soluzione 5 $^0/_{00}$, *meno densa*, ha, in questo caso, dimostrato maggiore efficacia che non quella al 10 $^0/_{00}$ *più densa*. Inoltre Di Mattei ha ottenuto con la sua soluzione di sapone al 100 $^0/_{00}$ la disinfezzione delle stoffe infette con vibrione colerigeno dopo 24 ore, se tali stoffe erano *bagnate*, dopo 12 ore se solamente molto *umide*, dopo 2 ore se invece *asciutte*. E alla sua volta il Beyer, mentre con soluzione di sapone al 30 $^0/_{00}$ raggiungeva dopo 24 ore la disinfezzione di tele infettate con culture pure di colera, la raggiungeva invece appena dopo 48 ore, se le tele erano infettate con fecce miste di vibrioni colerigeni, ovvero con siero di sangue contenente bacilli della difterite o stafilococchi piogeni.

Ora ciò è sufficiente per dimostrare perchè il sapone spiega in massima sulle biancherie infette un'azione disinfettante praticamente meno efficace, specie se ci si limita alla sola immersione e non interviene anche il fatto meccanico del soffregamento, che può facilitare la compenetrazione della soluzione saponosa, disfà le masse di sostanze nel sapone poco solubili e distacca le croste dalle superficie dei tessuti. E questo quindi, oltre a tutto quanto innanzi precede circa il solvente del sapone, l'azione dell'acido carbonico e della temperatura, e la composizione dei saponi, dà a sufficienza ragione dei risultati sfavorevoli del Beyer, che nelle sue indagini si è appunto limitato solo allo studio dell'azione delle soluzioni di sapone sulle biancherie infette, e spiega la differenza di essi da quelli di altri sperimentatori, che hanno studiato il potere disinfettante dei saponi comuni direttamente sulle culture pure.

VI.

Concludendo, da tutto quanto precede si rileva che:

1. il sapone, sia sodico sia potassico, ha un potere disinfettante proprio abbastanza notevole, non dovuto in special modo alle basi alcaline, nè agli acidi grassi, ma al sale che dalla perfetta combinazione di essi risulta;

2. l'alcalinità *libera* dei saponi è in genere tale che anche in soluzioni di sapone concentrate non può spiegare alcuna azione disinfettante;

3. l'alcalinità *che si libera* nelle soluzioni acquose dei saponi, neppure può spiegare un'azione pari a quella della rispettiva soluzione di sapone; e se essa vale a rinforzare l'azione di soluzioni molto deboli, non fa diminuire, scomparendo, il potere disinfettante delle soluzioni forti;

4. siccome i saponi non sono completamente solubili in acqua fredda, è alla parte solubile di essi che si deve il potere disinfettante della rispettiva soluzione, giacchè tale potere non si altera nelle soluzioni filtrate, e, neutralizzata l'alcalinità del filtrato, si comporta nella stessa maniera che quando si neutralizzano le soluzioni non filtrate;

5. i solventi che fanno precipitare il sapone non possono naturalmente che fare diminuire in proporzione il potere disinfettante delle soluzioni di esso, il quale potere diminuisce anche se le soluzioni vengono esposte in ambienti ricchi di acido carbonico;

6. la temperatura favorisce il potere disinfettante delle soluzioni di sapone, non solo pel noto fatto generale che le alte temperature rafforzano l'azione dei disinfettanti, ma altresì pel fatto che con aumento anche poco notevole della temperatura diminuisce in tali soluzioni la parte non disciolta;

7. siccome il potere disinfettante si deve propriamente ai saponi come sali alcalini degli acidi grassi, è naturale che tutto quello che può far diminuire nel sapone commerciale il contenuto di tali sali ne scema proporzionatamente l'azione disinfettante, la quale per conseguenza diminuisce in ragione dell'alto contenuto di acqua e di sostanze estranee;

8. i saponi contenenti resinati alcalini, cioè i così detti *saponi di resina*, in commercio oggi molto diffusi, spiegano un'azione disinfettante tanto più debole quanto maggiore è appunto il contenuto di resinati;

9. il potere disinfettante dei saponi può nella pratica della disinfezione della biancheria apparire poco efficace, sia per la difficoltà che le soluzioni concentrate di sapone incontrano nel compenetrare le stoffe, specie se bagnate, sia specialmente per la poca o nessuna solubilità ehe molte di quelle sostanze, delle quali le biancherie possono essere imbrattate, hanno nelle suddette soluzioni.

Cosicchè il sapone, pur essendo indubbiamente un buon disinfettante, può nella pratica della disinfezione riuscire inefficace o almeno poco efficace, per una delle condizioni che possono, nei modi che abbiamo visto, farne diminuire l'azione disinfettante.

Se all'influenza di un'ignota durezza dell'acqua, che è nella pratica il solvente più comune del sapone, è facile rimediare, sciogliendo questo

in forte proporzione, per esempio del 30 °/₀₀, non è certo egualmente facile conoscere se il sapone, che si ha fra mano, sia molto ricco di acqua e aggiunto di sostanze estranee, e se sopratutto contenga saponi di resina.

In genere, quando nella pratica della disinfezione si è costretti, per mancanza d'altro o per ragioni economiche, a ricorrere al sapone, è bene diffidare dei saponi potassici, come quelli che essendo teneri possono mascherare un forte contenuto d'acqua, e appartenendo specialmente al gruppo dei *saponi d'impasto*, sono sempre prodotti di qualità secondaria e contengono la glicerina e tutte le impurità, che esistono nelle materie grasse, nell'alcali ecc.

E' bene diffidare pure dei saponi comuni colorati, specialmente in verde e molto più in giallo o in bruno, perchè essi possono contenere più o meno abbondante la resina, specie se provenienti dagli Stati Uniti d'America e dall'Inghilterra, dove i saponi resinati sono principalmente fabbricati, o se acquistati nei mercati della Tripolitania, della Tunisia, dell'Algeria, del Marocco, di Cuba, dell'America del Sud, che consumano grandi quantità di tali saponi fabbricati in Europa (Marazza). Si può essere quasi sicuri che la resina è in proporzioni abbastanza elevate nei saponi gialli o bruni, che specialmente se molli, sono per giunta i saponi più suscettibili di essere adulterati con ogni sorta di materie inerti.

I saponi, sui quali si può avere maggiore fiducia, sono quelli duri e bianchi, all'*uso di Marsiglia*, e i marmorati, come quelli che non possono contenere resina e non possono mascherare un forte centenuto d'acqua. Appartenendo i primi al gruppo dei *saponi liquidati*, che « sono puri come i sali cristallizzati dalle acque madri, nelle quali rimangono le impurità » (Marazza); ed essendo i secondi fabbricati col buon metodo dei primi, con la differenza che all'operazione della *liquidazione* viene sostituita quella della *marmoratura;* sono ambedue saponi eccellenti, sebbene possano soggiacere anch'essi all'aggiunta fraudolenta di materie inerti. In ogni modo però è esclusa con essi la possibilità di un eccessivo contenuto di acqua e della presenza dei resinati alcalini, che notevolmente e principalmente influiscono a scemare il potere disinfettante del sapone commerciale.

Ma siccome s'è visto che, anche allorquando si è in possesso di un buon sapone, questo spiega nella pratica della disinfezione delle biancherie, in uno cioè dei casi, nei quali più frequentemente si potrà fare ad esso ricorso, una molto limitata efficacia; così, pur riconoscendo ai veri saponi un notevole potere disinfettante proprio, vi si deve in pratica ricorrere il meno che è possibile, e solo quando non v'è proprio

altro mezzo di disinfezione, sul quale si possa maggiormente confidare. In tal caso è bene farne delle soluzioni concentrate, al 30–40 °/₀₀ e a temperatura possibilmente fra i 30° e i 40° C, e bisogna lasciarvi per molte ore gli oggetti da disinfettare, specie se trattasi di biancherie o di altre stoffe.

Io non ho fatto ricerche speciali sui saponi, ai quali siano state mescolate sostanze disinfettanti; ma dai risultati quasi concordi di altri ricercatori, che hanno visto che il potere disinfettante di tali saponi è per nulla o di poco diverso da quello dei saponi comuni, e che anzi il sapone diminuisce l'efficacia dei disinfettanti ad esso aggiunti, debbo ritenere che di tale aggiunta per nulla possa realmente avvalorarsi, nella pratica della disinfezione, l'efficacia disinfettante dei saponi.

Il meglio che possano fare i fabbricanti che, senza strapazzare l'economia dei loro clienti, vogliono mettere in commercio dei buoni saponi disinfettanti, è quello di conservare al sapone il notevole potere di disinfezione di cui è fornito, e quindi di fabbricare prodotti purissimi, che contengano di acqua quanto meno è possibile.

Novembre del 1897.

BIBLIOGRAFIA.

Koch R. — *Ueber Desinfection* — Mittheilungen des Kaiserh. gesundheitsamtes. Vol. I, pag. 234, 1881 (ciò che riguarda specialmente il sapone, a pag. 271).

Kuisl M. — *Beiträge zur Kenntniss der Bacterien im normalen Darmtractus* — Aerztliches Intelligenzblatt (münchener medic. Wochenschrift). Annata 32, numeri 36 e 37, 1885.

Di Mattei E. — *Sull'azione disinfettante dei saponi comuni* — Annali dell'Istituto d'igiene sperimentale della R. Università di Roma, serie II, vol. I, 1889.

Behring — *Ueber Desinfection, Desinfectionsmittel und Desinfectionsmethoden* — Zeitschrift für Hygiene, vol. IX, pag. 395, 1890.

Behring — Bekämpfung der Infectionskrankeit — Infection und Desinfection Versuch einer sistematischen Darstellung der Lehre von Infectionsstoffen und Desinfectionsmitteln — Leipzig. 1894, pag. 89.

Nijland A. H. — *Ueber das Abtödten von Cholerabacillen in Wasser* — Archiv für Hygiene, vol. XVIII, pag. 335, 1893.

Jolles M. — *Ueber die Desinfectionsfähigkeit von Seifenlösungen gegen Cholerakeime* — Zeitschrift für Hygiene und Infectionskrankeiten, vol. XV, pag. 460, 1893.

Jolles M. — *Weitere Untersuchungen über die Desinfectionsfähigkeit von*

Seifelösungen — Zeitschrift für Hygiene und Infectionskrankeiten, volume XIX, pag. 130, 1895.

REITHOFFER R. — *Ueber die Seifen als Desinfectionsmittel* — Arch. für Hygiene, vol. XXVII, pag 350, 1896.

BEYER T. — *Ueber Wäschedesinfection mit dreiprocentigen Schmierseifenlösungen* — Zeitschrift für Hygiene und Infectionskrankeiten, vol. XXII, pag 228, 1896.

Per la chimica e l'industria dei saponi, ho specialmente consultato:

NASINI R e VILLAVECCHIA V. — *Relazione sulle analisi e sulle ricerche eseguite durante il triennio 1886-89 nel laboratorio chimico centrale delle gabelle* — Roma, 1890, pag. 356.

MARAZZA E. — *L'industria saponiera con alcuni cenni sulle industrie della soda e della potassa* — Milano, 1896.

DEITE C — *Handbuch der Seifenfabrikation* — Berlin, 1896.

FIGURIER L. — Il sapone, il sale, il solfo (traduzione) — Milano, 1878.

Istituto d'Igiene della R. Università di Roma

SULLA DIFFERENZA

FRA

LE CARNI DI CAVALLO E QUELLE DI BUE O DI MAIALE

fresche e conservate

Studio critico di alcuni metodi

PER

FRANCESCO BATTELLI

La sostituzione fraudolenta della carne di cavallo alla carne di bue o di maiale, è, più che un fatto reale, una convinzione entrata nell'animo di tutti; cosicchè molti oggi si allontanano parzialmente dalle carni che erano soliti mangiare, solo per paura di essere ingannati e per la ripugnanza ingiustificata della carne di cavallo. In tali condizioni, è necessario che i metodi, con i quali si può distinguere la carne di cavallo dalla carne di bue o di maiale, siano, più che è possibile, sicuri e diano affidamento tanto ai commercianti onesti, quanto ai consumatori, che le frodi, in tal campo, non vanno impunite. Da tali considerazioni ha tratto origine lo studio presente, il quale ha per unico obbiettivo di constatare *se i metodi proposti per riconoscere la carne di cavallo da quella di bue o di maiale abbiano o no il valore che a loro si attribuisce.*

Convinti che dall'esame istologico ben poco aiuto si poteva trarre per distinguere le varie carni, specialmente quando sono finamente triturate, fu giocoforza ricorrere all'esame chimico, il quale oggi ha la preferenza e sembra, in realtà, più adatto a fornire risultati, se non ottimi, almeno soddisfacenti.

La carne di cavallo, oltre ad altre sostanze, contiene glicogeno in apprezzabile quantità; le carni di altri animali da macello, invece o non ne contengono affatto o ne contengono piccolissime quantità. Per la qual cosa, fu creduto possibile, isolando e pesando il glicogeno, di-

stinguere almeno la carne di cavallo da quella di bue e di maiale. E difatti tanto Niebel quanto Bräutigam ed Edelmann fondarono su questo fatto i loro metodi di indagine, i quali oggi sono in uso in tutti i laboratori di chimica applicata all'igiene.

Niebel, per la ricerca e determinazione del glicogeno, procede nel modo seguente: pesa 50 grammi di carne e, dopo di averla finamente triturata, la riscalda, per alcune ore, a bagno maria con 2 0 c. c. di acqua contenente 3 o 4 °/₀ di potassa caustica.

Separata la parte liquida dalla solida mediante filtrazione, precipita a freddo le sostanze albuminoidi per mezzo di una ripetuta aggiunta di acido cloridrico e di joduro di mercurio e potassio; filtra nuovamente e dal filtrato separa il glicogeno, precipitandolo con alcool, seccandolo ad una temperatura di 110.° C. e pesandolo.

Bräutigam ed Edelmann invece ricercano il glicogeno nel modo seguente: fanno bollire 50 grammi di carne sminuzzata con 200 c. c di acqua, ed il brodo raffreddato lo trattano con acido nitrico diluito per la separazione delle sostanze albuminoidi e quindi filtrano. Sul filtrato stratificano, in un tubo da saggio, acqua di jodio satura a caldo. In presenza di glicogeno si vede nella superficie di contatto dei due liquidi un anello rosso-bordeaux fino al violetto.

Mi valsi dei procedimenti sopradescritti, per eseguire sulle diverse carni da macello una serie di esperienze, i risultati delle quali ho esposto nei quadri seguenti:

Quantità di glicogeno nelle varie carni da macello.
METODO NIEBEL.

Numero	Qualità della carne	Glicogeno °/₀	Acqua °/₀	Numero	Qualità della carne	Glicogeno °/₀	Acqua °/₀
1°	Carne di cavallo	0. 820	75. 79	1°	Carne di maiale	traccia	75. 10
2°	»	0. 403	76. 15	2°	»	0. 000	71. 22
3°	»	0. 803	76. 75	3°	»	0. 042	73. 15
4°	»	1. 209	76. 75	4°	»	traccia	72. 98
5°	»	1. 111	61. 84	5°	Carne di manzo	0. 000	75. 50
6°	»	0. 682	74. 05	6°	»	traccia	74. 52
7°	»	0. 489	74. 85	7°	»	0. 000	73. 80
8°	»	1. 065	73. 96	8°	Carne di pecora	0. 000	74. 24
9°	»	1. 407	66. 95	9°	»	0. 000	72. 80

Glicogeno nelle varie carni da macello.
Metodo Bräutigam-Edelmann.

Numero	Qualità della carne	Colorazione nella superficie di contatto
1°	Carne di cavallo	Rosso bordeaux spiccato
2°	»	Rosso bordeaux spiccato
3°	»	Rosso bordeaux spiccato
4°	Carne di maiale	Nessuna colorazione
5°	»	»
6°	Carne di manzo	»
7°	»	»
8°	Carne di pecora	»
9°	»	»

Dalle esperienze su esposte risulta, che tanto con il metodo di Niebel, quanto con il metodo di Bräutigam ed Edelmann si può arrivare a distinguere nettamente la carne di cavallo dalla carne di maiale, di bue e di pecora. La precedenza però si deve dare sempre al metodo quantitativo, perchè con questo si separa, si pesa e si tratta il glicogeno con i reattivi adottati, mentre col metodo qualitativo, quando il glicogeno non è in quantità molto abbondante, la reazione è incerta e, qualche volta, anche nulla.

Dalle mie esperienze posso inoltre affermare che, affinchè il metodo di Niebel dia risultati soddisfacenti e comparabili è necessario: 1. che la carne subisca una cottura molto prolungata, (6–8 ore) per far disciogliere completamente il glicogeno; 2. che le fibre muscolari, nel separarle dalla parte liquida, siano pressate fortemente e ripetutamente lavate, allo scopo d'impedire perdite di glicogeno; 3. che durante la cottura della carne il liquido sia soltanto leggermente alcalino.

Perchè poi il metodo di Bräutigam-Edelmann dia risultati certi e molto netti è necessario di concentrare il brodo, ottenuto dalla cottura della carne, almeno ad un terzo; dimodochè, in queste condizioni, anche se il glicogeno contenuto nella carne sia poco, si dovrà avere una reazione coll'acqua di jodio, marcata e visibilissima. È superfluo avvertire che durante la concentrazione, il brodo non debba avere una reazione acida troppo forte per non provocare la scomposizione del glicogeno.

Se ora è cosa facile ricercare il glicogeno e separarlo dalla carne, e se è perciò facile distinguere la carne di cavallo fresca dalle altre

carni da macello, si può dire che sia altrettanto facile distinguere la carne di cavallo nelle salciccie, mortadelle, salami, ovvero nelle carni conservate?

Secondo le osservazioni di Niebel e di Bräutigam-Edelmann, si dovrebbe rispondere di sì, perchè il primo afferma che quando *codesti prodotti non siano da lungo tempo preparati* è possibile ritrovare in essi la carne di cavallo; ed i secondi affermano, anche più recisamente, che il glicogeno si trova nelle carni insaccate secche quando ad esse sia stata mescolata carne di cavallo. Ma dinanzi all'incertezza di Niebel ed alla sua affermazione, che se i composti di carne da lungo tempo preparati anche con carne di cavallo non contengono piu glicogeno e dinanzi al fatto che il glicogeno non è una sostanza stabile e che facilmente si trasforma per idratazione in glucosio, sorge il dubbio sull'esattezza dei risultati ottenuti da Bräutigam ed Edelmann. Onde la necessità di ripetere le esperienze nelle condizioni più naturali e più prossime alla realtà.

A tale scopo, ho fatto fabbricare una certa quantità di salciccie, alcune composte di metà carne di cavallo e metà carne di maiale; altre di carne esclusiva di cavallo. Quindi ho esaminato detti preparati servendomi del metodo di Niebel e di quello di Bräutigam-Edelmann; eseguendo la prima determinazione del glicogeno, il giorno dopo la fabbricazione delle salsiccie, poi ad intervalli di tre in tre giorni fino al dodicesimo, ed ho avuto i risultati seguenti:

Determinazioni del glicogeno nelle carni insaccate.

METODO DI NIEBEL.

Numero	Qualità della carne	Data della fabbricazione			Glicogeno %	Acqua %
1°	Salciccia di carne di cavallo	26	dicembre	1896	1.020	72.23
2°	»	29	»	»	0.427	67.89
3°	»	1°	gennaio	1897	0.104	63.10
4°	»	4	»	»	0.000	59.24
5°	»	7	»	»	0.000	54.52
1°	Salciccia di carne di cavallo e maiale	26	dicembre	1896	0.588	73.27
2°	»	29	»	»	0.198	69.00
3°	»	1°	gennaio	1897	traccia	62.25
4°	»	4	»	»	0.000	57.30
5°	»	7	»	»	0.000	54.00

Glicogeno nelle carni insaccate.
METODO BRAUTIGAM-EDELMANN.

Numero	Qualità della carne	Data della fabbricazione	Colorazione della superficie di contatto
1°	Selciccia di carne di cavallo	24 gennaio 1897	Rosso bordeaux
2°	»	27 » »	Rosso bordeaux meno marcato
3°	»	30 » »	Nessuna colorazione
4°	»	2 febbraio »	»
1°	Salciccia di carne di cavallo e maiale	24 gennaio 1897	Rosso bordeaux tendente al violetto
2°	»	27 » »	Rosso pallidissimo
3°	»	30 » »	Nessuna colorazione
4°	»	2 febbraio »	»

Dai risultati ottenuti, emerge chiaramente che nessuno dei due metodi ci permette di riconoscere la carne di cavallo nelle salciccie dopo alcuni giorni dalla loro fabbricazione. E ciò non già per la loro imperfezione, ma perchè probabilmente il glicogeno si è decomposto, per idratazione, col favore dell'acidità che costantemente si ha nelle salciccie. Per la qual cosa ci viene a mancare l'unico mezzo che avevamo per distinguere la carne di cavallo dalle altre carni da macello, e perciò, per ora, ci sembra difficilissimo, per non dire impossibile, di scoprire la sofisticazione della carne di maiale, con carne equina, nelle salciccie, nei salami, nelle mortadelle, ecc. quando sia passato un certo tempo dalla loro preparazione. La vigilanza sanitaria adunque sarà bene eser-

citarla su questi prodotti, quando sono freschissimi, perchè solo allora è possibile ritrovarvi la carne di cavallo, determinando o ricercando il glicogeno.

Non meno incerto dei metodi suddetti è quello proposto da Hasterlich, comunicato al Congresso dei chimici bavaresi per la chimica applicata. Consiste nel determinare il numero di jodio del grasso estratto dai preparati di carne o dalla carne stessa, poichè codesto numero di jodio è molto più elevato nel grasso di cavallo, che nel grasso di bue, di maiale, ecc. Ma all'autore sfuggiva un fatto di somma importanza e che merita di essere rilevato, ed è questo, che il grasso, specialmente nelle carni insaccate, ossidandosi lentamente, assorbe sempre meno jodio mano mano che l'ossidazione cresce. Onde, può avvenire che il grasso di cavallo ossidandosi nei preparati di carne, dia un numero di jodio che sia nei limiti stabiliti per il grasso di maiale e ciò specialmente quando piccole siano le quantità di carne di cavallo mescolate.

Anche più recentemente è stato proposto un altro metodo pel riconoscimento delle varie carni e discusso dai chimici della circoscrizione di Niederbarnim. Esso riposa sul comportamento delle fibre muscolari verso l'acido acetico. Si opera nel modo seguente: si priva la carne di tutto il grasso, s'immerge nell'acqua calda per toglierle tutti i sali che vi fossero stati aggiunti, quindi si tratta con acido acetico glaciale. Dopo 2 o 3 giorni si osserva il colorito delle fibre muscolari, delle quali quelle di cavallo si colorano nettamente in scuro; quelle di bue in bruno-chiaro; quelle di maiale in giallo-chiaro. Così anche le salciccie, sottoposte allo stesso trattamento, usato per la carne fresca, dovrebbero assumere colorazioni diverse a seconda della qualità della carne di cui sono formate. E perciò le salciccie fatte con sola carne di cavallo, manifesterebbero un colore bigio-scuro con tendenza al verde; quelle fatte con carne di bue e cavallo, bigio-scuro con tendenza al verde; mentre quelle di carne di cavallo e maiale, colore giallo-scuro con tendenza al verde.

Io ho eseguito questo metodo colle salciccie di carne di cavallo e maiale e con quelle di solo maiale e di solo cavallo: ma debbo confessare che il colore delle fibre in tutti e tre i casi non è stato mai tale da costituire differenze sostanziali e molto appariscenti.

Egualmente è avvenuto nel trattamento delle fibre muscolari con una soluzione alcoolica di potassa, fatta sciogliendo gm. 20 di KOH in c. c. 100 di alcool a 70 %. Poichè dopo 5 o 6 giorni che i grassi erano saponificati completamente, le fibre si depositarono e si ebbe con le diverse qualità di salciccie una uniformità nella colorazione delle fibre da non potercisi raccapezzare, oppure da non costituire differenze notevoli.



Dalle mie esperienze risulta, adunque, *che i metodi di Niebel e di Bräutigam-Edelmann, per il riconoscimento e la ricerca della carne di cavallo nelle altre carni, dànno risultati molto soddisfacenti, quando si operi su carni fresche e su preparati di carne egualmente freschi. Nelle carni insaccate vecchie non è più possibile scoprire tale sofisticazione, andando appresso al glicogeno, perchè questo, dopo pochi giorni dalla preparazione, è completamente trasformato. I metodi fondati sulla diversa colorazione che pigliano le fibre muscolari, trattate con acido acetico, o con potassa, non dànno indicazioni precise e nette; per cui siamo, per ora, completamente impotenti a riconoscere per via chimica la carne di cavallo nei preparati di carne fatti da qualche tempo.*

Istituto d'Igiene sperimentale della R. Università di Roma.

IL SACCHAROMYCES GUTTULATUS (ROB.)

OSSERVAZIONI

DEI DOTTORI

O. CASAGRANDI & L. BUSCALIONI

Il *sacch. Guttulatus* conosciuto sino dal 1855, per opera del Remack [1] come un organismo vegetale abbastanza comune nel tubo digerente del coniglio, è stato oggetto in questi ultimi anni di numerose osservazioni per parte del Moulin e del Robin, [2] del Purkinje, del Bohmer, del Mitscherlich, del Perroncito e di uno di noi. [3]

Quasi tutti gli autori lo avrebbero trovato non solo nel tubo digerente dei conigli, ma anche nell'intestino di altri mammiferi e persino dei rettili, ed anzi dalle osservazioni del Perroncito, risulterebbe che neppure l'uomo ne é immune, poichè egli rinvenne il fungo in questione in individui affetti da Anchilostomiasi. [4]

Il Winter [5] nella sua opera sui funghi, ammette pure la presenza di quest'organismo nello intestino dei mammiferi, degli uccelli e dei rettili, ma noi crediamo dover notare a questo proposito che solo quando si avranno più rigorose osservazioni comparative si potrà stabilire con sicurezza se i differenti vertebrati alberghino nel loro intestino unicamente il *saccaromyces Guttulatus* o non piuttosto differenti forme di saccaromiceti. [6]

---

[1] *Diagnose u. Pathol. Unters.* Berlin, 1845.

[2] *Des Végétaux qui croissent sur les animaux.* Paris, 1847.

[3] *Il Sacc. Guttulatus.* Malpighia, Anno X, 1896.

[4] *I parassiti dell'uomo.* Milano, 1882.

[5] *Die Pilze,* 1884.

[6] Nelle feci dell'uomo, uno di noi (*Casagrandi*) ha notato che non è difficile rinvenire delle specie di saccaromiceti, simili al *Sacc. gutt*, le quali però quando vengono sottoposte a studi particolareggiati si dimostrano differenti.

Ricerca e isolamento.

La presenza del *sacch. Gutt.* è, si può dir sempre, manifesta nelle feci dei conigli: infatti, per quanto abbiamo potuto osservare, il fungo deve essere comunissimo, poichè ci fu dato di rintracciarlo negli escrementi dei conigli provenienti da località disparatissime, analogamente a quanto ebbero ad osservare altri autori.

Siccome è oltremodo raro che il fungo manchi nelle feci, cosi per metterlo in evidenza basta semplicemente spappolare in acqua una certa quantità delle stesse e sottoporre di poi il materiale all'esame microscopico anche senza ricorrere a forti ingrandimenti.

In tale caso il fungo si presenta sotto la forma di cellule ovoidali, molto allungate, che contengono nel loro interno quasi sempre due vacuoli e talora anche dei granuli splendenti.

Se si esamina il contenuto intestinale delle singole porzioni dell'intestino del coniglio si incontra quasi sempre costantemente la stessa forma, salvo nello stomaco dove il *sacch.* non si trova più allo stato di individui isolati, ma in piccoli gruppi di parecchie cellule, le quali possono inoltre anche perdere la ordinaria forma allungata per assumere quella puramente ovalare.

Le cellule che hanno quest'ultima forma rappresentano quasi costantemente degli individui giovani del *sacch. Guttulatus.*

Noi abiamo cercato di isolare il *sacch.* dalle feci spappolando in acqua distillata e sterilizzata un po' di materiale fecale di conigli fortemente infetti e poi facendo semine per strisciamento su piastre di agar acido e zuccherato, preparato secondo la formula proposta da uno di noi per la ricerca dei Saccaromiceti. [1]

In questo mezzo, dopo 12 ore circa, di soggiorno alla temperatura di 35°, si nota lungo la linea di innesto, la formazione di colonie biancastre, rotondeggianti, piuttosto asciutte, le quali esaminate al microscopio mostransi costituite da cellule ovoidali, più piccole di quelle

---

[1] Questo terreno consterebbe di brodo di patate (che si puo fare in vario modo: p. es., secondo il metodo di Holz) agarizzato, glucosato, e, ove occorra, acidificato con acido tartarico. Però esso si può in molti casi, con abbastanza successo, sostituire coll'agar agar glicerinato, glucosato e acidificato, che si prepara in modo molto semplice, aggiungendo 4–6 gocce di una soluzione sterilizzata di acido tartarico al 10 % e di glucosio al 50 % a 5 cc. di agar glicerinato previamente, anche esso sterilizzato. (V. Casagrandi, *Sui terreni culturali per la ricerca dei saccaromiceti.* « Rif. medica », 17 gennaio 1897).

ovoidali-allungate del *sacch. Gutt.* delle feci. Esse sono simili, se non identiche, alle piccole cellule ovoidali che si trovano nello stomaco del coniglio.

Identico risuttato si ha dallo innesto del contenuto stomacale di questi ultimi.

Di fronte alla notevole differenza morfologica tra le cellule ovoidali allungate delle feci e quelle ovoidali delle culture, è naturale che prima di ogni altra cosa ci proponessimo di stabilire quali relazioni passassero tra le due forme di organismi. I preparati a goccia pendente tenuti a 35° ed osservati ad intervalli brevi, al pari delle culture in agar tenute a 35° per 5-6-12 ore e poi lasciate alla temperatura ordinaria, condussero alla soluzione del quesito.

Di fatti, nei preparati a goccia pendente si potè osservare che le forme ovoidali-allungate, proprie delle feci e dell'intestino, gemmano ai poli dando origine talora a forme simili che si succedono l'una all'altra, molto più spesso però producendo delle gemme che non appena hanno acquistato la forma ovaidale producono a loro volta delle cellule simili che continuano a moltiplicarsi nello stesso modo. In tal guisa si formano colonie e cellule le quali hanno completamente perduta la forma ovoidale allungata per assumere quella puramente ovoidale. La moltiplicazione di queste ultime è così rigogliosa da invadere tutto il campo ed impedire così di seguire l'ulteriore moltiplicazione delle forme ovoidali allungate.

Nelle culture in agar fatte per strisciamento e lasciate nel termostato, si può vedere dopo circa 12 ore dall' innesto, dalla periferia della patina sviluppatasi comparire tante fine ramificazioni aderenti alla superficie del terreno nutritivo, le quali esaminate al microscopio, si mostrano appunto costituite da filari di cellule ovoidali allungate ricordanti, per forma il *sacch. Gutt.* delle feci dei conigli. Queste cellule poi, nel punto in cui si uniscono con un altro elemento, producono delle nuove gemme, ma queste in generale non assumono più la forma allungata, ma rimangono piccole ovoidali, È quindi evidente che in questo caso ha luogo la trasformazione delle cellule ovoidali allungate in cellule ovali, la cui attività riproduttiva presenta tale energia da coinvolgere ben tosto in un ammasso di elementi ovali le ramificazioni dalle quali esse sono prodotte.

Del resto in breve, anche le cellule terminali delle ramificazioni generano pure delle cellule ovoidali, di guisa che nelle culture va ben tosto perduta la forma primitiva del *sacch. Gutt.*

Da tali ricerche è lecito conchiudere che il *sacc. Gutt.* il quale nell' intestino del coniglio ha forma ovoidale-allungata, messo a colti-

vare in terreni idonei al suo sviluppo, assume una forma perfettamente ovoidale che mantiene di poi quasi costante.

Struttura delle cellule.

a) *Forma.* Nel contenuto intestinale le cellule sono grandi μ 6-8 × 15-20 e quindi si presentano molto più lunghe che larghe. Esse sono isolate, di forma ovoidea-allungata, a contenuto bivacuolato, sparso talora di granuli splendenti.

Nel contenuto gastrico qualche volta si incontrano delle cellule grandi circa la metà delle precedenti (μ 4–5 × 6–8) di forma ovoidale, per lo più univacuolate e con granuli splendenti. Oltre a ciò, in questa parte dell'apparato digerente, le cellule sono spesse volte riunite in gruppi di pochi elementi

Nelle culture su agar acido e glucosato, gli elementi del fungo in questione presentano costantemente la forma ovoidale, mentre nel brodo e nella pappa di patate, abbiamo dapprima le stesse forme che poi nelle culture vecchie sono sostituite in parte da forme variamente allungate, quasi bastonciniformi. All'estremità di queste si notano però assai spesso delle cellule ovoidali che, paragonate con quelle che si incontrano normalmente nei mezzi solidi, appaiono più grandi.

b) *Nucleo.* Come già ebbe a dimostrare uno di noi (*Buscalioni*) tanto nelle cellule di *sacch.* contenute nello stomaco quanto in quelle disseminate nello intestino o nelle feci dei conigli si nota la presenza di un nucleo discretamente grande il quale trovasi localizzato nella parte mediana degli elementi, a ridosso quasi di una delle pareti longitudinali.

Il nucleo lascia difficilmente intravedere una struttura speciale; ciò non di meno qualche volta mostra distinta una membrana, e qualche granulo di cromatina. Esso poi viene messo in evidenza soltanto dall'ematossilina diluita a cui si faccia seguire l'azione di alcuni decoloranti come l'acido picrico o l'allume di ferro ammoniacale.

Nelle cellule in gemmazione le quali si mostrano quasi esclusivamente nello stomaco del coniglio, il nucleo si allunga e poscia si divide in due metà una delle quali rimane in sito, mentre l'altra si porta nella gemma, rimanendo tuttavia molte volte ancora aderente per un certo tempo all'altra metà per mezzo di un filamento che coll'ematossilina si colora alquanto più intensamente del plasma circostante. Noi non abbiamo potuto stabilire con sicurezza quale sia la natura di siffatto prolungamento, ciò nondimeno non siamo alieni dal credere che esso possa per avventura corrispondere al così detto *Mittelstück* dei nuclei in segmentazione di alcune alghe, alla membrana nucleare che tiene uniti i nuclei in divisione nelle Peronosporee (Wager) e ad altre analoghe formazioni studiate dal Dongeard e dal Sappin Troffi nei nuclei di taluni funghi.

In alcuni casi il nucleo, prima di dividersi, si porta vicino al polo da cui nasce la gemma.

La metà del nucleo che penetra in quest'ultima si assottiglia e si allunga per superare lo stretto canale che mette in comunicazione le due cellule, ma arrivato poi nella parte mediana della gemma, si stacca dall'altra metà, si arrotonda e ritira la porzione di filuzzo che la manteneva unita a quest'ultima.

Nel *Sacch.* in sporificazione ha luogo dapprima la divisione nucleare in tre o quattro nuclei secondari, la quale avviene o pel processo testè descritto, oppure in modo da ricordare, sebben lontanamente, un processo coriocinetico. I nuclei secondari si allontanano dapprima gli uni dagli altri e si distribuiscono per tutta la massa protoplasmatica; più tardi però si raccolgono nella parte mediana di questa e quivi diventano come altrettanti centri attorno a cui si organizzano le spore.

Nei *Saccharomiceti* delle colture abbiamo presso a poco gli stessi fatti. Per procedere alla colorazione di questi nuclei noi abbiamo fatto uso dell'ematossilina *Böhmer* o di quella del *Delafield*, entrambe preparate da poco tempo. In queste soluzioni, estremamente diluite, abbiamo immersi di poi i vetrini copri oggetti spalmati con differenti culture di *Sacch. Gutt.*, dopo di aver fissati questi ultimi col calore. [1] I vetrini lasciati in termostato alla temperatura di circa 30° C per 24 ore, vengono di poi decolorati. A questo scopo noi abbiamo fatto uso tanto dell'acido picrico, quanto dell'allume di ferro ammoniacale. Ottenuto un sufficiente grado di decolorazione, le preparazioni vennero infine montate sul balsamo del Canadà, previi, naturalmente, i soliti passaggi in alcool ed in xilol.

Coi surriferiti metodi di colorazione noi abbiamo potuto vedere che la forma, la posizione, la struttura e la grandezza del nucleo variano alquanto a seconda dei mezzi di cultura in cui vegeta il *Sacch. Gutt.* Nelle giovani culture in brodo e nelle patate, quando cioè non ha ancora luogo l'allungamento della cellula, il nucleo trovasi per lo più ad uno dei poli degli elementi ovoidali e presenta una forma rotonda. Esso però mostrasi alquanto più piccolo del nucleo dei *Sacch.* viventi nello intestino del coniglio, e trovasi inoltre costantemente addossato ad una massa globosa, probabilmente di natura grassa. [2] Egli è naturale che data la piccolezza dell'elemento in questione non sia possibile rilevare dei fini dettagli strutturali nella sua costituzione, quantunque più volte ci sia occorso di vedere distintamente colorati alcuni granuli di cromatina.

Coll'allungarsi delle cellule nei vecchi terreni culturali noi riscontriamo che il nucleo viene per lo più ad occupare la parte mediana delle stesse ed intanto cambia di forma, si allunga o presenta delle strozzature, in modo da lasciar sospettare che esso sia in via di involuzione.

---

1 Taluni potrebbero obbiettare che il metodo in questione provochi, a causa dell'alta temperatura, la coartazione del protoplasma ed alteri quindi notevolmente la struttura delle cellule; noi possiamo però assicurare che l'obbiezione non ha valore di sorta, avendo avuto occasione di confrontare il processo testè descritto con altri in cui l'azione delle alte temperature era esclusa.

2 Cfr. in proposito: CASAGRANDI, *Ueb. d. Morphol*, *d. Hefe. Centralbl, f. Bakt., II. Abt.*, 1897.

In questo periodo dell'evoluzione del fungo non mancano neppure le figure che ricordano le frammentazioni nucleari più tipiche, quali si osservano nei vecchi nuclei di alcune piante superiori e ciò malgrado che non abbia quivi luogo gemmazione di sorta. Qualche volta poi nelle cellule molto allungate il nucleo non rivela più la sua presenza, per cui tutto induce a credere che gli elementi così conformati siano in via di disorganizzazione.

Nelle grandi cellule ovalari che accompagnano quelle allungate delle vecchie colture, i nuclei conservano la forma rotonda ed inoltre appaiono quasi sempre situati verso uno dei poli della cellula. Essi poi sono tanto più grandi, quanto più voluminose sono le cellule che li contengono. Degno di nota si è poi che gli elementi presentano un protoplasma più denso delle cellule allungate, per cui è lecito ammettere che le forme ovali rappresentano elementi non ancora invecchiati.

Nelle colture in agar, dove noi abbiamo soltanto delle forme piccole ed ovoidali, il nucleo trovasi pure localizzato verso uno dei poli.

Se si esaminano le colture in agar, in brodo od in patate, in cui è ancora attiva la formazione delle gemme, si osserva che il nucleo, nei momenti che precedono la produzione di queste, o più di rado dopo che le stesse son formate, si porta verso il polo da cui trae origine la cellula figlia e quivi giunto si divide. Ordinariamente la divisione ha luogo dopo che la cellula in formazione ha già raggiunto un certo sviluppo. Talora però si nota anche che il nucleo non si avvicina alla gemma, ma si divide in sito, ed allora una delle metà nucleari deve compiere un certo tratto di cammino per portarsi nella cellula figlia.

A quanto pare, in tutti i casi, la divisione ha sempre luogo per frammentazione, ma data l'esiguità dei corpi in questione è naturale che non si possa precisare esattamente come accade il fenomeno. Sta però il fatto che, a differenza di quanto avviene nel *Sacch. Gutt.* del contenuto intestinale, il così detto ***Mittelstück*** appare ben di rado e d'ordinario non è mai molto sviluppato, in quanto che esso si rompe prima ancora che le due metà nucleari siansi notevolmente allontanate le une dalle altre. Le nostre ricerche ci portano anche a ritenere che il tratto di unione sopra citato si mostri quasi esclusivamente nei saccaromiceti allungati, poichè non ci fu mai dato di osservarlo nelle forme di *Sacch.* ovali, dove i nuclei appena entrano in divisione, si rompono quasi subito in due metà.

La divisione nucleare avviene per lo più nel piano perpendicolare all'asse maggiore o longitudinale degli elementi; ciò nondimeno talora ha anche luogo in un piano opposto od obliquo al medesimo, ed in questi casi una delle metà nucleari deve in certo qual modo scivolare sull'altra per portarsi nella gemma.

In tutti i casi il nucleo che penetra nella gemma è dapprima più piccolo di quello che rimane nella cellula madre.

Noi abbiamo finalmente trovato che nelle forme allungate di *Sacch. Gutt.* nelle quali aveva talora luogo una gemmazione laterale, anzichè polare, il nucleo della cellula madre veniva pure ad occupare un punto prossimo alla gemma, prima di entrare in divisione.

Dai fatti esposti non rimane più dubbio circa la stretta relazione che passa tra la posizione del nucleo ed il punto in cui si forma la gemma, malgrado che in alcuni casi eccezionali, per cause non ben note, il nucleo possa anche dividersi, mantenendo una posizione alquanto discosta dalla cellula figlia. Tale relazione è anche resa evidente dal fatto che molto spesso, appena è avvenuto il passaggio di una metà nucleare nella cellula figlia, l'altra metà si porta al polo opposto a quello che ha dato origine a quest'ultima.

Prima di terminare questi cenni sul nucleo del *Sacch. Gutt.* crediamo ancora utile di notare che a seconda del mezzo in cui si coltiva il fungo, il nucleo appare più o meno evidente: ciò dipende dalla circostanza che il *sacch.* può immagazzinare una quantità più o meno grande di sostanze granulari, fortemente tingibili coll'ematossilina, le quali in taluni casi arrivano a mascherare alquanto la massa nucleare, ed a rendere quindi comprensibile come alcuni autori abbiano talora scambiate le due produzioni, per quanto siano tra loro differentissime per grandezza, struttura e via dicendo.

c) *Glicogeno.* Uno di noi (*Buscalioni*) ebbe a dimostrare che nel *Sacch. Gutt.* contenuto nell'apparato digerente del coniglio vi ha del Glicogeno. Questa sostanza si manifesta in scarsa quantità negli elementi del fungo che vivono nello stomaco; aumenta poi a misura che gli stessi progrediscono lungo l'intestino per venir infine consumata durante la formazione delle spore o nel periodo di tempo che il *Sacch.* vive fuori dell'animale. Non tutte le cellule sono fornite ugualmente di glicogeno, potendo alcune esserne affatto sprovviste, mentre all'opposto altre ne sono riccamente fornite.

Il Glicogeno si trova disseminato nel protoplasma, ove forma degli ammassi spesso multipli, vari per forma e per grandezza: questa sostanza non è mai presente nel nucleo e fors'anco neppure nei vacuoli e quando le cellule gemmano passa dalla cellula madre nella cellula figlia, quantunque per lo più non sia mai molto abbontante in quest'ultima, almeno nei primordi della sua evoluzione.

Per quanto concerne i Saccaromiceti delle culture siamo in grado di affermare che il glicogeno non è mai molto abbondante e che nelle giovanissime culture in substrati solidi mostrasi in maggior copia che in quelle corrispondenti praticate in substrati liquidi.

Nelle vecchie culture in mezzi liquidi ed in patate si nota, sotto il punto di vista che ci interessa, una certa differenza tra le cellule ovoidali e quelle allungate; in queste ultime il glicogeno manca spesso o non è molto abbondante, essendo rari gli elementi che ne contengono una quantità piuttosto considerevole, mentre nelle cellule ovoidali la stessa sostanza pare assai diffusa, in specie poi negli elementi di maggior dimensione. È molto difficile stabilire quali siano le cause che inducono un così diverso comportamento; tutto al più si può ritenere che la scomparsa del glicogeno nelle cellule allungate stia in relazione col processo di involuzione, cui le stesse, come abbiamo detto, vanno incontro.

Caratteri culturali.

a) *in gelatina su piastre.* Colonie superficiali più grandi di una capocchia di spillo, rotondeggianti, un po' rilevate, a contorno un po' irregolare, che solo molto tardivamente tende a venire areolato, biancastre, umidiccie, a contenuto (osservato a debole ingrandimento) grossolanamente granuloso.

Colonie profonde più piccole di una testa di spillo, di forma irregolarmente sferoidale, a contorno piuttosto irregolare, a contenuto grossolanamente granuloso;

b) *in agar acidificato e glicerinato, su piastre.* Colonie superficiali più grandi di una capocchia di spillo, un po' sollevate nel centro, a bordi areolati ramosi. Colonie profonde più piccole, un po' irregolari a bordi piuttosto lisci.

c) *In gelatina per infissione.* Sviluppo in superficie costituito da una patina bianco sporca, poco diffusa dal punto di innesto, leggermente umida, un po' sinuosa, poco rilevata, ombellicata per lo più nel centro. Sviluppo lungo l'infissione sotto forma di un cordoncino biancastro dal quale, specialmente verso la parte alta dello stesso, si dipartono tante fine barbe che si dirigono verso la periferia.

d) *in agar solidificato a becco di flauto.* Formazione di una patina poco spessa, un po' umida se l'*agar* è alcalino, piuttosto asciutta se è acido e glucosato, di colorito bianco sporco, a margini regolari, tendenti, nelle vecchie culture, ed emettere fisse ramificazioni parallele alla superficie del terreno nutrizio se l'agar è acido e glucosato;

e) *Sui dischi di patate.* Formazione di una patina piuttosto asciutta, alquanto rilevata, bianco sporca, a superficie pianeggiante, nella quale si notano qua e colà dei punticini rilevati biancastri, a bordi pure rilevati, sinuosi e un po' pulverulenti;

f) *in brodo acido e glucosato.* Formazione del velo in 12 ore a 35° C, sotto forma di una patina poco spessa, bianco-pulvurulenta, che tende a rimontare le pareti del vaso.

Moltiplicazione.

a) *Riproduzione per gemmazione:*

1° Nello stomaco ha luogo la formazione di gemme e queste si formano ai poli delle cellule, restando a lungo attaccate alla cellula madre; è però difficile trovare delle colonie che constino più di 5–8 cellule;

2° Nelle colture avviene pure la gemmazione e le gemme si formano parimenti ai poli delle cellule, o, più di rado, lungo il lato maggiore di questa. Le cellule figlie restano attaccate all'elemento riproduttore e gemmando, a tempo debito, a loro volta danno origine a colonie formate da un gran numero di individui;

b) Riproduzione per ascospore:

1° *Saccharomyces delle feci.* Se si prendono lè feci di coniglio e si lasciano un poco essiccare, poscia si bagnano copiosamente e si lasciano nuovamente divenir secche (dopo di aver però tolto l'eccesso di acqua) alla temperatura dell'ambiente, ed infine, dopo tre o quattro giorni, si sottopongono ad un ultimo innaffiamento, si nota che molte cellule sporificano. Le spore sono ovali, possono variare da una a quattro e si trovano quasi sempre raccolte nella parte mediana delle cellule.

A quanto pare, oltre all'umidità, anche la temperatura dell'ambiente e altre cause non bene note, devono esercitare una certa influenza sulla produzione delle spore, in quanto che nei saggi che abbiamo fatto durante l'inverno, non siamo riusciti ad ottenere queste ultime, mentre i tentativi fatti in altre stagioni ci hanno dato dei risultati soddisfacentissimi;

2° *Saccharomyces delle colture.* I molti esperimenti che abbiamo fatto per ottenere le spore dal *Sacch. Gutt.*, coltivato in vari mezzi e sottoposto alle più svariate condizioni sono rimasti, sino ad ora, completamente negativi. Questo fatto però non deve recar meraviglia, poichè è noto che molti *Saccharomyces*, posti in determinate condizioni di esistenza, perdono la facoltà di sporificare che poi magari tornano ad acquistare quando vengano a mutare sia le influenze interne che esterne.

Proprietà biologiche.

a) Proprietà secretive e decompositive:

1° *Pigmento.* Il *sacch. gutt.* non produce pigmenti di sorta.

2° *Proteolisi.* Il *sacch. gutt.* non fluidifica la gelatina, almeno per quanto ci permettono di giudicare le esperienze continuate per circa 8 mesi.

3° *Coagulazione.* Il *sacch. gutt.* dopo vari mesi può determinare una piccola precipitazione di caseina granulare. La reazione del latte non è acida.

4° *Diastasi.* Innestato in pappa d'amido non produce zucchero.

5° *Inversina.* Innestato in liquido contenente saccarosio lo inverte in glucosio.

6° *Fermentazione alcoolica.* Determina la formazione di alcool dal *glucosio* direttamente e dal *saccarosio*, dopo di averlo invertito. Noi non abbiamo sino ad ora potuto dimostrare che eserciti un'analoga azione sul *maltosio* e sul *lattosio.*

7° *Fermentazione ossalica.* Non la determina.

8° *Fermentazione citrica.* Non la determina.

9° *Fermentazione acetica.* Nei liquidi glucosati, dopo varii mesi si forma una discreta quantità di acido acetico.

b) Limiti di resistenza.

1° *Alla temperatura secca.* Resiste a 37° per 6 settimane. Muore a 100° nello spazio di 1 minuto.

2° *Alla temperatura umida*: Resiste a 60° per un ora; resiste a 70° per $^1/_2$ ora; muore a 100° in un minuto.

3° *All'inanizione*. Resiste nell'acqua distillata per qualche mese.

4° *All'acidità del substrato*. Si abitua gradatamente a vivere in un terreno sempre più acido. Infatti siamo riesciti a farlo sviluppare persino in agar glicerinato contenente l'8 °/₀ di acido tartarico.

5° *All' alcalinità del substrato* Ne abbiamo ottenuto lo sviluppo in agar glicerinato contenente sino il 5 °/₀ di carbonato sodico.

Patogenesi.

Le ricerche che noi abbiamo fatte sulla patogenesi del *Sacch. Gutt.* hanno avuto di mira i seguenti problemi: 1° Studiare se ii fungo che vive nell'intestino dei conigli e di altri animali possa determinare qualche lesione apprezzabile; 2° osservare se il medesimo introdotto nell'organismo animale per altra via che non sia quella del tratto digerente, provochi qualche azione patogena.

1° *Significato del Seccharomyces guttulatus nel tubo digerente degli animali.*

Sotto questo punto di vista abbiamo esperimentato sui conigli e sui cani dando a mangiare a questi animali quantità rilevanti di colture di *Sacch. Gutt.* ed osservando di poi le possibili alterazioni che potevansi determinare nel tubo gastro-enterico, comprendendo naturalmente anche nelle nostre ricerche lo studio delle possibili alterazioni del ricambio matoriale.

Riassumeremo i risultati ottenuti nel seguente quadro:

Animali sperimentati	Quantità del materiale fatto ingerire	Stato delle funzioni digerenti dedotte dall'esame delle feci	Ricambio materiale dedotto dall'esame delle urine	Morte degli animali a datare dall'ultima ingestione	Esame macroscopico dell'intestino e del suo contenuto	Esame microscopico dell'intestino e del suo contenuto
Coniglio I . . .	Si fanno ingerire 6 patine di culture di 48 ore in agar acido e glucosato, emulsionandole con 50 cc. di acqua distillata, e ciò per 3 giorni consecutivamente.	Normale	Normale	Si uccide dopo 15 giorni.	Nessuna alterazione apprezzabile.	Nessun punto dell'intestino attrae l'attenzione per farne oggetto di speciali ricerche istologiche. L'esame del contenuto mostra la presenza del *Saccharomyces guttulatus* come nei conigli normali. Forse trovansi nel crasso più numerose del normale le forme ovoidali. Però nelle feci esiste una grande quantità di forme allungate-ovoidali.
Coniglio II. . .		Id.	Id.	Si uccide dopo 10 giorni.	Id.	
Coniglio III . .		Id.	Id.	Si uccide dopo 20 giorni.	Id.	
Coniglio IV . .		Id.	Id.	Si uccide dopo 30 giorni.	Id.	
Cane I.	Si fanno ingerire 100 cc. della stessa emulsione, e ciò per 3 giorni consecutivi.	Id.	Id.	Non si uccide		
Cane II		Id.	Id.	Id.		
Cane III		Id.	Id.	Id.		

Come si rileva dal quadro su esposto, nessuna alterazione apprezzabile si riesce a dimostrare nei conigli o nei cani in seguito all'ingestione del *sàccharomyces guttulatus*. Gli animali, dopo l'ingestione, seguitano a vivere senza presentare alcuna nota riferibile ad alterato chimismo o ad alterazioni sia fisiologiche che anatomiche dell'intestino.

Non si può quindi, a rigor di termini, ritenere che la presenza nel tubo intestinale, del *saccharomyces guttulatus* riesca dannosa per gli animali, tanto più che quella parte d'alimento che il fungo può sottrarre all'organismo in cui vive non è certo tale da influire sfavorevolmente sulla nutrizione di questo, per quanto siffatta sottrazione sia relativamente considerevole.

In quanto poi al sospetto che potrebbe nascere che, cioè, il fungo invece di agire nel senso sopra indicato, possa all'occorrenza comportarsi da *mutualista* mettendo in attività qualcuna delle sue proprietà funzionali (inversina, ecc.) in modo da tornar di giovamento, sia pure parziale, all'organismo che lo ospita noi non abbiamo per ora alcun dato che ci autorizzi a ritenere che una tale ipotesi sia più o meno attendibile. Sino a prova contraria noi ci crediamo quindi autorizzati a ritenere che il *saccharomyces guttulatus* anzichè un parassita, sia semplicemente un saprofita nel senso che i botanici accordano a questa parola, oppure un semplice commensale nel senso della parassitologia animale. [1]

2° *Significato del saccharomyces guttulatus introdotto negli organismi per altre vie.*

Stabilito il nessun valore patogeno del *sacch. guttulatus* contenuto nel tubo gastro-enterico degli animali abbiamo voluto vedere se allo stesso risultato si sarebbe pervenuti introducendo il fungo nell'organismo per altre vie.

Riassumiamo nei seguenti quadri le nostre esperienze in proposito:

a) Inoculazioni sottocutanee.

(Si inocula una cultura su agar acido e glucosato di 48 ore, emulsionandola in 2 c.c. di acqua distillata).

Animali esperimentati. Conigli IV. Cavie II. Topi II.

Morte degli animali:

I conigli	muoiono	in	18-30	giorni.
Le cavie	»	in	18-20	»
I topi	»	in	14-16	»

---

[1] Si potrebbe anche ammettere che la presenza del sacch. gutt. nell' intestino costituisca semplicemente una specie di *Rhaum parasitismus.*

Reperto. Nel sito dell'inoculazione si ha la formazione di noduli a contenuto puriforme variabili per grandezza da una letticchia ad una fava.

b) Inoculazioni endoperitoneali.

(Si inocula c. s.)

Animali esperimentati. Conigli III. Cavie II Topi II.

Morte degli animali.

I conigli	muoiono	in 15-18	giorni.
Le cavie	»	in 10-12	»
I topi	»	in 10-12	»

Reperto. Nel peritoneo parietale e viscerale trovansi disseminati qua e colà uno o più noduli a contenuto puriforme variabili per grandezza da un granulo di miglio ad un cece.

c) Inoculazioni endovenose.

Si inocula c. s. 1 c.c. dell'emulsione nella vena dell'orecchio del coniglio.

Conigli sperimentati, n. 4

Morte degli animali: in 6–8 giorni.

d) Inoculazione negli organi.

1° *Nei bargigli dei polli.*

Polli esperimentati, n. 4.

Si forma una tumefazione molliccia, tra le lamine dei bargigli, che raggiunta la grandezza di un cece in circa 10 giorni scompare.

2° *Nelle mammelle dei conigli.*

Mammelle inoculate, n. X.

Si forma nello spessore della chiandola una tumefazione molliccia che già al 4° giorno lascia fuoriuscire una sostanza cremosa, densa, simile a pus. Più tardi la ghiandola torna allo stato normale.

Nei casi in cui il materiale puriforme non può svuotarsi all'esterno, dopo un po' di tempo si riassorbe purchè naturalmente, non intervengano i piogeni che determinano la formazione di un vero ascesso.

Conclusioni.

Dallo studio che abbiamo fatto sul *sacch. Gutt.*, possiamo conchiudere che questo:

1) È un saccaromicete che vive normalmente nello stomaco e nello intestino dei conigli, sviluppandosi però soltanto nello stomaco dei medesimi, da dove è coltivabile in differenti terreni.

2) Ha una forma nelle colture che diversifica da quella ovoidea allungata che si trova nelle feci, e si presenta nei mezzi solidi (agar) per lo più ovale, mentre in altri substrati (specialmente se vecchi) si allunga molto, continuando però sempre a produrre delle cellule ovalari.

3) È fornito di un nucleo che durante la gemmazione e la sporificazione si divide per frammentazione [1] dando luogo a nuclei secondari che sono spesso uniti da un pezzo intermedio (*mittelstück*) il quale però è poco manifesto nelle forme coltivate: questo nucleo nelle cellule allungate delle vecchie culture degenera frammentandosi disordinatamente od assumendo varie forme, nelle cellule in gemmazione si porta verso il polo da cui nasce la gemma, mentre nelle condizioni di riposo occupa la parte mediana degli elementi, se questi sono allungati, oppure è più avvicinato ad uno dei poli allorchè le cellule sono ovoidali.

4) Posssiede nel suo protoplasma del glicogeno il quale è specialmente abbondante nelle cellule che vivono nell' intestino ed in quelle più grandi delle culture.

5) Si sviluppa in substrati culturali, assumendo caratteri alquanto diversi a seconda dei terreni, ma abbastanza costanti nel medesimo terreno.

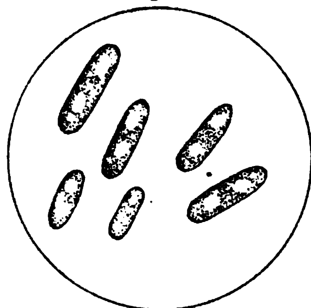
6) Si moltiplica tanto per gemme che per spore; queste ultime si formano nelle feci mantenute alternativamente al secco ed all'umido, ma la loro produzione è subordinata a particolari condizioni non per anco ben note.

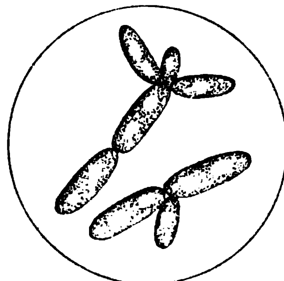
7) Possiede la proprietà di produrre alcool dal glucosio e di invertire il saccarosio.

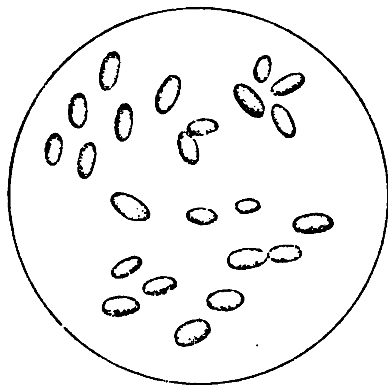
8) Dal punto di vista patogenico è capace: *a*) di produrre delle formazioni nodulari a contenuto puriforme nel connettivo sottocutaneo e nel cavo peritoneale delle cavie, dei topi e dei conigli, come pure nelle mammelle di quest'ultimi e nei bargigli dei polli: *b*) di provocare la morte degli animali inoculati per la via sottocutanea ed endoperitoneale (conigli, topi, cavie) la quale avviene in un tempo variabile da 15 a 30 giorni pei conigli, dai 10 ai 20 giorni per le cavie e dai 10 ai 16 giorni pei topi, come pure di uccidere in 6-8 giorni i conigli inoculati per la via endovenosa.

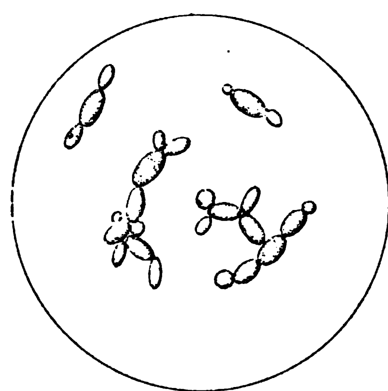
Roma, gennaio 1898.

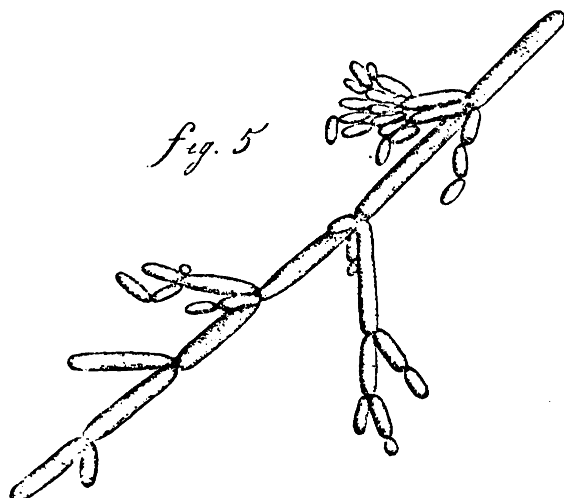
[1] Nella sporificazione del fungo si osservano talora delle figure che ricordano lontanamente alcuni stadi della cariocinesi (*Buscalioni*).

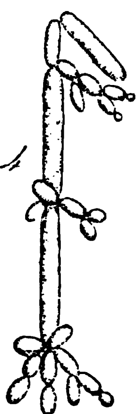

fig. 1.


fig. 2


fig. 3.


fig. 6


fig. 5


fig. 4

E. Battisti. Roma.

SPIEGAZIONE DELLE FIGURE.

Tav. II.

Figure (Fig. 4ª e 5ª) dimostranti la trasformazione delle cellule ovoido-allungate delle feci (Fig. 1ª) e dello stomaco (Fig. 2ª) nelle cellule ovoidali (Fig. 3ª e Fig. 6ª) delle culture.

Tav. III.

Fig. 1ª Colonia (molto ingrandita) di *sacch. gutt.* in agar acido e glucosato.
» 2ª *Sacch. gutt.* in gemmazione nello stomaco del coniglio.
» 3ª *Sacch. gutt.* in gemmazione nelle culture in brodo.
» 4ª *Sacch. gutt.* nelle feci del coniglio.
» 5ª Cellule ovali delle colture in agar acido glucosato.
» 6ª Colonia giovane poco ingrandita in gelatina alcalina.
» 7ª Cultura in goccia pendente (brodo acido e glucosato).
» 8ª Culture in brodo di *sacch. gutt.*: gemmazione e divisione del nucleo.
» 9ª Nuclei delle cellule ovali ed allungate delle culture in brodo.
» 10ª Nuclei delle cellule di una vecchia cultura su patate.
» 11ª Cellule costituenti i bordi delle vecchie colonie su agar-agar acido glucosato e quelli delle vecchie culture per strisciamento fatte sullo stesso terreno.
» 12ª Cellula di una vecchia cultura su patate: frammentazione del nucleo.
» 13ª Cultura per infissione in gelatina.
» 14ª Culture per strisciamento su agar alcalino.
» 15ª Vecchia cultura per strisciamento su agar acido e glucosato a bordi con fine ramificazioni.

Istituto d'Igiene sperimentale della R. Università di Catania

STUDI SULLA RABBIA

Memoria I.

LA RABBIA SPERIMENTALE NEL LUPO

RICERCHE

DEL

Prof. Dott. EUGENIO DI MATTEI

Uno studio sulla rabbia sperimentale del lupo può a taluno sembrare a prima giunta non tanto importante, circa le sue pratiche applicazioni, quanto al certo originale, specialmente se considera la natura e l'indole non mite degli animali adoperati nelle esperienze, la difficoltà di poterne avere a disposizione un numero sufficiente, il disagio non lieve della manualità operatoria, ed anche infine la possibilità del pericolo di potere andar soggetti ad accidenti sinistri, da parte di questi animali riottosi e dagli istinti sempre selvaggi, durante il periodo della infezione rabbica, loro trasmessa sperimentalmente.

E certamente tutto considerato, in quanto alla originalità del lavoro, egli non s'ingannerebbe di certo, tanto più se a tutte le considerazioni sopraesposte aggiungesse l'altra non meno rilevante, cioè che la bibliografia di ricerche sperimentali in proposito tace completamente.

Però se egli si è occupato con amore dell'argomento e in ispecie per ciò che riguarda lo sviluppo e il decorso dell'infezione rabbica nei diversi animali, non potrà più disconoscere che la originalità e l'importanza del presente studio vanno alla pari, perchè non potrà certo dissimulare a sè stesso che una vera lacuna e di grande interesse esiste nello studio di tale infezione, lacuna propriamente determinata dalla mancanza di ricerche sperimentali nell'indirizzo di quelle da noi intraprese; infatti non potrà egli negare la parte non piccola che in questa

infezione ha il lupo, tanto nella diffusione epidemica di essa in altre specie animali, quanto per l'esito ben funesto nella sua trasmissione all'uomo.

Ed in vero che il lupo possa andar soggetto alla rabbia e che in detto animale questa possa svilupparsi, come nel resto dei carnivori del genere *canis* e *felis*, è cosa notissima ed antichissima. La scienza registra la famosa epizoozia di rabbia dei lupi avvenuta nel 1590 a Montbeliard (1) grave per la durata, per la diffusione in altre specie animali (volpi, cani, sciacalli) e per la mortalità degli individui morsicati. Non meno celebre fu poi l'epizoozia di rabbia dei lupi nella Slesia, avvenuta nel 1725, e quell'altra nella Svezia nel 1824, nelle quali i lupi diffusero più tardi l'infezione nelle volpi, nei cani e nei gatti (Dechambre).

E vuolsi anche che la terribile epidemia di rabbia delle volpi in Europa, che durò più di 30 anni, dal 1803 al 1838 e che cominciò ai pie' delle Alpi giurassiche, abbia avuta la sua prima origine nell'infezione dei lupi, animali che sembrano realmente più degli altri carnivori disposti a tale infezione.

In Rumania poi la rabbia dei lupi è comunissima e sono questi animali che poi la diffondono con le morsicature ai cani. [1]

Ma se da queste notizie d'ordine epidemiologico e puramente generale, noi passiamo più direttamente alla sostanza della questione che riguarda lo sviluppo, il decorso, l'esito di questa infezione nel lupo, allora ci troviamo a dirittura in un campo di vaghe supposizioni, per le quali intanto ci sfugge la possibilità di accrescere le nostre conoscenze sulla patologia di questa infezione, come ci sfugge altresì l'altro fatto, tanto utile per la profilassi, cioè quello degli effetti funesti, ai quali l'infezione rabbica di questo animale quasi costantemente conduce, quando per avventura l'uomo ne ha avuto trasmessi i germi del contagio.

Nè questo è tutto; di fronte alle incertezze accennate, anche il metodo di cura, che ha basi tanto solide nella comune infezione rabbica dei cani, deve risentirne senza dubbio gli effetti, e diventa infatti anch'esso poco sicuro; cosicchè si avvilisce da un lato il coraggio di coloro che vittima della ferocia dei lupi arrabbiati si vedono votati alla morte, e si scuote dall'altro la fede di coloro che, praticando il comune metodo profilattico Pasteur, ne vedono spesso fallire l'efficacia. Da cui poi i dubbii sulla bontà ed utilità di tal metodo curativo.

---

[1] Sulle epizoozie rabbiose degli animali rapaci vi sono molte osservazioni di Franque Kochlin, Oertel e poi la vasta collezione di Schmidt-Zool. Klinik. Bd. I pag. 322. Berlin, 1872.

E d'altro canto, se noi consultiamo la statistica della mortalità dei morsicati da lupo in genere, si vede che questa è addirittura scoraggiante, come del pari triste è quell'altra che rispecchia la mortalità dopo la cura. E intanto tutti gli autori che si sono occupati degli effetti ultimi della rabbia del lupo, trasmessa all'uomo e in questo curata o non curata, si trovano concordi nell'affermare la gravità dell'infezione nei morsicati da questi animali, e si adoperano alla meglio a mettere avanti degli argomenti induttivi, che purtroppo aspettano ancora la loro conferma nel controllo delle ricerche sperimentali, che non sono facili, e che prima delle presenti, finora nessuno ha condotto.

L'importanza dell'argomento del resto si faceva anche sentire da un altro punto di vista, come appresso più estesamente diremo; cioè che la vera statistica sulla efficacia della cura Pasteur, si doveva fondare sui morsicati da lupo, come i veri e soli casi che potevano fare fidanza della sicurezza dell'avvenuto contagio e della certezza del decorso grave dell' infezione.

Si aggiunga a ciò che la infezione rabbica da parte dei lupi non può nemmanco dirsi rara, poichè pur troppo disgraziatamente in alcuni nostri paesi e specialmente nella Russia, questi animali, che ne sono più comunemente affetti fra gli animali selvaggi, danno un contributo notevole alla malattia, che comunicano anche di frequente all'uomo, contro cui inveiscono. Da ciò la triste realtà della statistica. che dopo la grossa percentuale della malattia del cane registra quasi immediatamente quella del lupo, col contrassegno della gravità e della temibilità.

A proposito di questa gravità delle morsicature da lupi arrabbiati, Arloing (2) dice che esse sono sempre più gravi di quelle dei cani e che « quante persone sono morsicate, altrettante sono votate alla rabbia ».

Galtier (3) poi a più riprese manifesta le stesso concetto; egli dice che fra i carnivori, a condizioni uguali, il lupo mordendo trasmette più sicuramente e più gravemente la rabbia che il cane; e poi più in là aggiunge che i lupi arrabbiati si attaccano alla vittima con una ferocia inaudita, facendo morsicature di una estrema gravità.

Anche Bouley e Brouardel (4) dicono che i lupi diffondono la rabbia d'una maniera tanto più terribile, in quanto sembra che il virus rabbico passando per il loro organismo acquista una più grande attività; e dal punto di vista delle loro conseguenze le ferite inflitte dai lupi arrabbiati sono di una grande gravità di fronte a quelle inflitte dai cani.

Roger (5) si limita soltanto ad accennare il concetto comune senza approfondirlo, cioè che le morsicature sono più gravi quando sono fatte dai lupi, che allorquando sono prodotte dai cani; e colla statistica rileva la corrispondente grande mortalità dei morsicati da lupi di fronte ai morsicati da cani.

Zagari (6) non dice al di là degli altri, poichè egli si limita ad accennare che la rabbia del lupo ha una grande prevalenza sulla statistica della mortalità; e ciò perchè le morsicature di questo animale, sia per la moltedlicità come per la gravezza, più sicuramente innestano e lasciano attecchire il virus rabbico. Come si vede egli dá maggior peso alla quantità di virus inoculato che alla natura del virus stesso.

Ma Bollinger (7) dopo avere affermato che fra tutti gli animali, le più pericolose sono le morsicature dei lupi arrabbiati, a proposito della gravezza delle ferite, dice che queste non possono spiegare tutte le tristi conseguenze della infezione, tanto più che si sa che le grandi ferite in generale sono meno pericolose delle piccole, fatto riconosciuto da Dioscoride 18 secoli or sono, giacchè le prime sanguinando si sbarazzano meglio del virus.

Il Pasteur (8) poi, nelle sue numerose memorie all'Accademia delle Scienze, insiste abbastanza sulla gravità delle morsicature da lupo arrabbiato, e dice che la mortalità per esse è considerevole, se si paragona agli effetti delle morsicature del cane. E Gamaleja e gli altri scolari del Pasteur ne convengono.

E per non andar molto a lungo, tutti gli autori si mostrano preoccupati della sorte dei morsicati da lupi arrabbiati. Anzi in Russia, dove più frequenti sono questi casi, è tanto temuta la gravità del morso del lupo arrabbiato, che oramai è penetrata nella coscienza popolare la convinzione che chi è morsicato da lupo arrabbiato, è condannato inesorabilmente alla morte per rabbia. (Arloing, Galtier).

Ma vediamo almeno, prima di passare alla statistica della mortalità, di dare un cenno della statistica delle morsicature.

Petermann (9) dell'ospedale militare di Mosca su 112 individui morsicati, ne contò 88 per cani arrabbiati, 18 per lupi e 6 per altri animali.

Parschensky (10) a Samara fra 47 individui morsicati ne aveva 36 da cani, 4 da lupi, senza contarne altri 3 morsicati da lupi, non venuti al suo Istituto per la cura, e gli altri 4 da altri animali.

Wyssokowitsch (11) nel 1889 a Karkoff porta 194 morsicati da cane e 17 da lupo.

Pasteur (12) nel solo anno 1887, fra 389 morsicati che ricorsero per la cura al suo Istituto ne contò 38 morsicati da lupi, e il resto da altri animali.

Cosicchè, senza più bisogno di rilevare ulteriori cifre, si vede che la percentuale dei morsicati da lupi, stando a quelle riferite che sono esatte, perchè rilevate dai registri degli Istituti antirabbici, va a più del 10 $^{0}/_{0}$. E dico più, perchè non tutti i morsicati da lupo ricorrono o sono in grado o fanno a tempo di ricorrere agli stabilimenti di cura; nelle predette statistiche infatti figurano soltanto, come abbiamo detto, quelli che richiesero nei vari Istituti antirabbici la cura Pasteur. Molti altri o muoiono subito o poco dopo che sono stati avventati dai lupi, o anche in un tempo relativamente breve, tanto da non essere più al

caso di ricorrere agli Istituti di cura e figurare nelle loro statistiche. La statistica di mortalità intanto ha risultati più scoraggianti, specialmente se essi si paragonano a quelli per rabbia di cane. Vale la pena di intrattenercene per un momento.

È noto dalle statistiche fatte nel dipartimento della Senna per gli anni 1881, 1882, 1883 che su 100 persone morsicate da cani, ritenuti arrabbiati ne muoiono in media 15 secondo Leblanc (13) e Dujardin-Beaumetz (4); come altresì è noto che questa media può oscillare secondo altre numerose statistiche soltanto di poco in più; così arriva a 16-17 secondo Arloing (l. c.), Galtier (l. c.), Faber (15), Brouardel ecc.; raggiunge 20-23-25 secondo i dati raccolti dal De Giaxa (16) ed altri. Va ben inteso che noi non facciamo molto assegnamento su medie di mortalità che sono molto più basse della prima da noi accennata, cioè quella di 15; poichè le statistiche dell'Austria portano medie molto basse, cioè di 12, 11, 10, 5 (!) morti su 100 morsicati (Galtier) (17).

Nei morsicati da lupo invece la mortalità diventa desolante.

Nella seduta dell'8 aprile 1886 Mathieu (18) ricordava alla Società centrale di Medicina veterinaria un fatto riferito nel 1826, quello di 27 persone morsicate da due lupi arrabbiati e delle quali ben 18 soccombevano alla rabbia. Nella stessa seduta Chuchu (19) ricordava un altro fatto ben più grave, accaduto nel 1820, di un altro lupo arrabbiato che aveva morsicato ben 30 persone, tra le quali qualcuna soltanto scampò alla morte.

Venendo ad epoche più vicine a noi, rileviamo subito quanto Pasteur (20) in una comunicazione all'Accademia delle Scienze riferiva, a proposito dei dati raccolti dalle statistiche dei morsicati da lupi.

In una 1ª osservazione parla di 8 persone, morsicate da un lupo arrabbiato, le quali soccombono tutte alla rabbia.

In una 2ª osservazione riferisce di 9 persone, morsicate da un lupo arrabbiato, delle quali ben 8 soccombono all'infezione.

In una 3ª osservazione narra che di 19 individui morsicati da un lupo, 11 soggiacciono all'infezione.

In una 4ª osservazione accenna a un individuo morsicato da lupo arrabbiato, e che muore ugualmente.

In una 5ª osservazione dice che di 3 persone morsicate da lupo arrabbiato, nessuna si salva.

In una 6ª osservazione racconta il caso di altre 3 persone morsicate da un lupo arrabbiato, che soccombono tutte e tre ugualmente alla rabbia.

In una 7ª osservazione sono 4 persone che morsicate da un lupo arrabbiato soccombono tutte alla rabbia.

In un'8ª osservazione infine, di parecchie persone morse al solito da un lupo arrabbiato, nessuna riesce a salvarsi.

Anche Parschensky (21) narra di 3 individui morsi da un lupo e che soccombono tutti e 3 di rabbia; e Hoin (22) rapporta l'osservazione di 17 persone morsicate da un lupo arrabbiato, delle quali ben 12 perirono.

Queste osservazioni scoraggianti e che io abbrevio, si riflettono tristamente nella statistica. Infatti i dati raccolti da Pasteur, Brouardel, Du-Mesnil stabiliscono che nelle morsicature di lupo arrabbiato la mortalità è del 70 % (23)! E Galtier (24) la rende più triste ancora, portandola ad 8-9 su 10, cioè all'80-90 %. Secondo le ricerche di Mathieu e Chuchu (25) la mortalità sarebbe dell'82 % e troverebbe un certo riscontro nella mortalità elevata delle osservazioni del Pasteur. Secondo poi le statistiche di Renault e basate sopra 254 casi suoi, su 395 casi di Wallet, su 342 di Du Mesnil, su 168 di Bombarda e su 137 di Gamaleja (26), la mortalità sarebbe del 62 %-64 %.

Come ben si vede in ogni caso il confronto tra la media di mortalità dei morsicati da cane e la media di mortalità dei morsicati da lupo non si regge; abbiamo nel primo caso la tenue media del 15-16 %, nel secondo la gravissima media del 70-80 %.

E il confronto continua a non reggersi, quando dalla statistica di mortalità dei morsicati non assoggettati alla cura Pasteur, si passa a quella dei morsicati che han fatto la cura predetta.

Petermann (27) racconta di Gorbounoff di Perim che morsicato da un lupo arrabbiato, soccombeva all'infezione rabbica durante la cura.

Gamaleja (28) narra di un certo Saitchik (osservazione di Bardach), morso da un lupo arrabbiato, che se ne moriva di rabbia dopo il trattamento. Narra ancora che nel Caucaso ben 18 persone furono morsicate da un lupo arrabbiato; 13 delle quali si sottoposero alla vaccinazione, e di queste ne morirono ben 8 durante la cura.

Rioche (29) racconta di un certo Mallard che morsicato da lupo arrabbiato, ricorre alla cura e muore durante il trattamento.

Pasteur (30) dice che egli dispera della vita di quei russi, che morsicati da lupi arrabbiati ricorrono a Parigi per la cura; infatti erano parecchi i decessi che egli contava di questi sciagurati, morti durante o dopo la vaccinazione. Lo abbiamo visto di già che di 19 russi venuti da Smolensk, 3 sono morti non ostante la cura; e dei 9 di quelli venuti da Wladmir 3 sono morti anch'essi malgrado la cura.

E Gamaleja (l. c.) mentre curava 2 individui morsi da lupi, scrivendo al Pasteur diceva: « Ho sotto cura una ragazza di 16 anni e un uomo, morsicati da lupo, ed io tremo ad ogni momento della loro vita ». Da ciò egli traeva argomento a combattere le pretese statistiche di guarigione della rabbia in seguito alla cura, ed era disposto a ritenere che la vera statistica della efficacia della cura Pasteur dev'essere fornita dai morsicati da lupi arrabbiati. E dopo aver discusso le statistiche di Renault sui casi di Wallet, Du Mesnil, Bombarda ecc., rileva che sempre grave è la mortalità delle persone morsicate da lupi arrabbiati, anche quando esse vengono assoggettate alla vaccinazione.

Anche De Blasi, direttore dell'Istituto antirabbico di Palermo, recente-

mente (15 ottobre 1897) mi forniva i particolari interessantissimi della storia di 6 individui, morsicati in Caltagirone (provincia di Catania) da una lupa idrofoba, e ricorsi all'Istituto dopo un paio di giorni dalla morsicatura, per intraprendere la cura specifica. Di questi 6 individui, che avevano subito il trattamento antirabbico intensivo, ben 4 soccombettero alla rab ia; uno subito dopo la cura, gli altri 3 dopo qualche giorno da questa [1].

Si ha infatti all'Istituto Pasteur su 52 casi 9 morti; in quello di Odessa su 46 casi 8 decessi, in quello di Mosca su 18 casi 2 decessi, in quello di Samara su 4 casi 0 morti, un complesso così di 120 casi, con un totale di 19 morti. ciò che corrisponde a una mortalità media del 16 °|₀ [2]. Questa cifra però viene attenuata dal Suzor, (31) il quale facendo una statistica sopra un numero maggiore di casi, 199 in tutto, curati in Russia e a Parigi, viene ad una media del 12, 6 °|₀ di mortalità.

Se noi però ci riferiamo ad altri dati, raccolti dal Pasteur, Brouardel, Du Mesnil, vediamo che la media di mortalità per la cura sarebbe ridotta a 14,06 °|₀ (Arloing); e noi crediamo che essa sia più prossima al vero, rappresentando la media delle medie, cioè la cifra intermedia fra la prima media di 16 °|₀ e la seconda di 12 °|₀.

Certamente non volendosi mostrare troppo preoccupati di ciò che è nella coscienza popolare, dobbiamo convenire, studiando serenamente la cosa, che la vaccinazione opera dei prodigi anche nei morsicati da lupi arrabbiati, quando essa è capace di ridurre la mortalità del 70-80 °|₀ al 14-15 °|₀ (Vulpian) (52 ; ma non possiamo d'altro canto negare che se queste cifre si mettono in rapporto con le altre, proveniente dalle persone morsicate da cani arrabbiati e sottoposte al trattamento della vaccinazione, il confronto non regge più e rimane sempre scoraggiante per i morsi da lupo; poichè per quanto riguarda i cani abbiamo una mortalità minima del 0,5 °|₀, e per quanto riguarda i lupi il 14-16 °|₀. Ciò che in altri termini ci fa concludere che *di 100 individui morsicati da lupi arrabbiati e sottoposti alla cura Pasteur, ne muoiono lo stesso numero che ne muore su 100 individui morsicati da cani arrabbiati, non sottoposti alla cura.*

Cosicchè ne consegue che corre lo stesso grado di pericolo, la stessa probabilità di poter ugualmente soccombere all'infezione rabbica, tanto chi morsicato da lupo arrabbiato ricorre alla cura, quanto chi morsicato da cane arrabbiato non vi ricorre!

Ed ecco perchè di fronte a questi dati eloquenti della statistica, nasce naturalmente la domanda della causa della ineguaglianza di

[1] Dei 6 individui, i quattro morti furono morsicati gravemente in regioni scoperte (mani, viso), i 2 ancora viventi furono morsicati lievemente e in regioni coperte (torace, coscia, ecc.).

[2] Non computiamo i casi del De Blasi, non essendo ancora pubblicata dall'A. la relazione in proposito.

azione del virus nei due animali, uno che dobbiamo chiamare virulentissimo, chè miete tante vittime, l'altro relativamente debole, chè ne uccide pochissime.

È proprio qui che noi troviamo la grande lacuna sperimentale da tutti riconosciuta, e per la quale tutti si sono sforzati, in mancanza di opportune ricerche, di dare delle spiegazioni alla buona, in verità anche ingegnose e razionali, basate in parte sulla pratica e su quel cumulo di circostanze complesse che formano il patrimonio della clinica.

Ma ad onta di ciò, mancando le ricerche sperimentali, la lacuna resta tal quale, tanto più che non manca una certa discrepanza nelle vedute degli autori.

Mathieu (33) per esempio pensa, abbastanza giudiziosamente secondo Galtier, che la nocività del virus rabbico del lupo è superiore alla nocuità del virus rabbico del cane di strada, e che la virulenza può essere attenuata nella più parte dei cani domestici, in seguito a certe influenze, come il regime ecc., a cui sono sottoposti questi ultimi animali.

Gamaleja (34) che pur tanto teme per la vita dei suoi vaccinati se morsicati da lupo, pensa invece che la gravità possa dipendere dalla quantità di virus abbondante penetrato coi morsi.

Dello stesso parere, come abbiamo visto, è Zagari, (35) che a conferma, porta in campo le esperienze del Poppi, (36) il quale con inoculazioni multiple riesce nei conigli ad abbreviare il periodo di incubazione.

Galtier (op. cit.) però come chi volesse conciliare le superiori vedute, pensa che la morsicatura del lupo è più dannosa di quella del cane, sia perchè essa è sempre più profonda e inocula meglio il virus, sia perchè la bava del lupo ha delle *proprietà più energiche*.

Ed il Pasteur stesso ne convenne più tardi. Infatti mentre egli dapprima non credevasi autorizzato ad ammettere che il virus del lupo fosse più attivo di quello del cane, pel fatto che l'inoculazione di midollo allungato di persone morte di rabbia del lupo, fatta a cani, conigli, cavie avesse prodotto la morte di questi animali quasi nello stesso periodo di tempo e con la stessa incubazione delle solite inoculazioni provenienti da virus di strada, tanto da ammettere che « il virus del lupo e quello del cane avessero sensibilmente la stessa virulenza », più tardi invece egli fu pronto a ricredersi

Ed invero non più molto sicuro delle precedenti ottimistiche affermazioni, impressionato fortemente degli insuccessi di Gamaleja ad Odessa, insuccessi dovuti a terribili casi di morsicature, in gran parte causate dai lupi, scrivendo più tardi a Duclaux diceva: « io ho potuto constatare sui numerosi russi morsicati che vennero a reclamare a Parigi le inoculazioni preventive della rabbia, fino a che punto in certe circostanze in Russia *le ferite da lupo* (e anche da cane qualche volta), potevano essere come *dese-*

spérées et à courte incubation (37) ». E perciò consigliava il Gamaleja a fare tutte le inoculazioni di vaccinazione in 24 ore.

Del resto si poteva obbiettare alla prima affermazione del Pasteur, che nella inoculazione del midollo dell'individuo morto, per morso da lupo, il passaggio del virus attraverso l'organismo umano aveva potuto subire una certa attenuazione, analogamente al virus quando passa attraverso l'organismo della scimmia.

Ma il Galtier che nella maggiore o minore nocuità del virus del lupo, che pur ammette, non vede la vera ragione della grande proporzione dei casi di rabbia, dati dalle morsicature di questo animale, crede più ragionevolmente di spiegare il fatto colla natura ed entità della ferita, diversa nei due animali; il cane si limita a mordere le parti del corpo che sono alla sua portata e spesso rivestite di abiti, il lupo invece più furioso si avventa alla testa, alla faccia, al collo con vera ferocia e fa delle morsicature vaste ed estese, interessando tessuti molto profondamente e ledendo nervi, gangli, glandole, e inoculando così più profondamente del cane, una abbondante quantità di virus, maggiore di quella del cane istesso, in tessuti che meglio si prestano all'assorbimento. Dopo tutto ciò egli ammette sempre che il virus del lupo è poi per sopraggiunta più attivo, più dannoso di quello del cane e cosí conclude: « In allora io lo ripeto non ripugnerebbe punto alla ragione di ammettere che il virus rabbico, passando nell'organismo del lupo o in quello di alcuni cani che gli s'avvicinano dippiù, potesse ivi trovare un terreno dei più favorevoli ed acquistare un grado d'intensità superiore; e se l'esperimento (non molto facilmente attuabile) non ha potuto ancora confermare il fatto, non ha però completamente dimostrato la sua impossibilità; e l'osservazione piega in suo favore, tanto più che il virus rabbico si attenua sicuramente o si esalta, secondo lo si fa passare attraverso un tale o tal altro organismo animale, erbivori, scimmie, conigli, ecc. » (38).

Ma il Pasteur quando correggeva la sua prima affermazione, non diceva soltanto che le ferite del lupo erano *desespérées*, ma aveva aggiunto « *à courte incubation* », cosa che mentre implicitamente appoggia il concetto di una maggiore virulenza del virus, ci fa eziandio ritenere necessario di approfondire le notizie sulla durata del periodo d'incubazione del virus da lupo.

Esiste infatti una vera e notevole differenza fra il periodo di incubazione del virus di cane e quello del virus di lupo, come almeno si può rilevare dai casi meglio studiati.

Petermann (l. c.) racconta che un suo morsicato da lupo arrabbiato, un certo Gorbounoff, fu preso dallo sviluppo della malattia dopo soli 15 giorni ed è a notare che costui si trovava in corso di cura.

Gamaleja (l. c.) riferisce un'osservazione di Bardach, in cui un altro individuo morso il 15 giugno, moriva anch' egli durante la cura il 30 giugno, cioè dopo 15 giorni.

Riferisce ancora di altri 13 individui, dei quali 8 morirono in poco tempo, e fra essi alcuni in poco più di 35 giorni.

In un'osservazione di Rioche, un altro individuo morsicato il 14 aprile, moriva il 19 maggio, cioè in 35 giorni.

Nei 18 casi di Mathieu la durata dell'incubazione fu nella maggior parte dei casi di 19 a 30 giorni, e in 2 casi di 40 a 42 giorni, e in un sol caso di 52 giorni.

Nelle osservazioni raccolte da Pasteur abbiamo che 8 persone morsicate, muoiono tra 17 a 68 giorni; che 11 altre persone muoiono dopo un periodo d'incubazione di 7, 13, 15 e qualcuna di 70 giorni; un altro individuo muore dopo 32 giorni; altre 3 persone muoiono dopo 22, 23, 38, giorni; altre due persone muoiono dopo 25-30 giorni; altri quattro individui muoiono rispettivamente dopo 9, 13, 15, 19 giorni.

E anche nei casi, comunicatimi dal De Blasi, le persone morsicate e curate morivano rispettivamente dopo 31, 35, 47 giorni e l'ultima dopo circa 80 giorni.

Se ora consideriamo i pochi casi di morte già enumerati che sono 58, esclusi quelli del De Blasi ancora inediti, che del resto possono rientrare nell'osservazione generale, troviamo che in circa la metà di essi la morte è sopravvenuta in poco più di 15 giorni, senza contare quei casi ad incubazione più breve, di 7, 9, 13 giorni; nel resto dei casi la morte è sopravvenuta fra 22 e 35 giorni; solo in pochi individui, veri casi isolati, si è avuta un'incubazione più lunga, di 40, 42, 52, 68, 70 giorni. Ora, benchè sappiamo quanto siano variabili le condizioni che possono fare modificare i dati statistici, relativi al periodo d'incubazione nell'uomo, e quindi non scevri di difficoltà i posteriori confronti tra il periodo d'incubazione del virus del cane e quello del virus del lupo, pure abbiamo sempre tanto in mano da rilevare nei due casi delle differenze così marcate da permetterci conclusioni sicure.

La mortalità per rabbia in seguito a morsicature dei cani cade nella maggioranza dei casi nei primi due mesi dopo l'infezione; entro i tre mesi si manifestano i $^{4}/_{5}$ dei casi, il resto si distribuisce in periodi più lunghi, divenendo sempre più rari a misura che il tempo aumenta (Pasteur, Bauer, Brouardel, Bouley, Schivardi, Bordoni-Uffreduzzi).

Come si vede dal sopradetto, la differenza nel periodo d'incubazione dei due virus è notevolissima. Pel virus del lupo la mortalità umana per rabbia cade in circa la metà dei casi in poco più di 15 giorni; che i $^{4}/_{5}$ dei casi si manifestano in circa 30 o in poco più di 30 giorni; il resto dei casi, che sono i pochi, si distribuiscono in periodi di tempo più lungo, oscillante da 40 a 60-70 giorni.

Cosicchè il periodo d'incubazione nell'uomo, per la morsicatura del lupo arrabbiato, si riduce a un terzo o a metà al massimo di quello del cane. Ed era appunto sull'evidenza di queste cifre che Pasteur di-

ceva che « la durata d'incubazione della rabbia umana per morsicature di lupo arrabbiato è spesso cortissima, molto più corta che quella della rabbia per morsicatura del cane ».

Dato adunque che la rabbia del lupo non è rara, che di essa abbiamo frequenti epizoozie, che si diffondono per contagio negli animali selvaggi e nei domestici, che le morsicature di questo temibile animale arrabbiato hanno una gravezza straordinaria, che il virus di esso è ritenuto come esasperato, che il periodo d'incubazione nell'uomo è cortissimo, che la mortalità è massima, e che la comune cura di Pasteur riesce spesso inefficace, ad onta delle modificazioni fatte subire al trattamento, è naturale che la ricerca sperimentale, come dice lo stesso Galtier, si impone e diventa necessaria, per portar luce a tutte le questioni predette e per veder quali, fra le affermazioni ed ipotesi emesse, fossero quelle che il controllo sperimentale avrebbe potuto confermare.

Ma l'esperimento non è facile, seguita il Galtier, e tale difficoltà rende la lacuna quasi impossibile ad essere colmata,

Ed in vero, quando io pensai all'argomento per portare il mio piccolo contributo alla questione, resi giustizia al Galtier, poichè mi resi subito edotto delle difficoltà gravissime che avrei potuto incontrare e soprattutto per la deficienza che avrei potuto avere di tali animali, e poi per la loro poca mitezza. Però alcune circostanze favorevoli sopravvenute d'un tratto, mi fecero dissipare i primi dubbi. Infatti un bel dì, in uno dei boschi delle nostre provincie, dai contadini, che vanno espressamente alla caccia dei temuti animali, furono presi vivi 7 lupetti e furono portati in città per essere venduti al Giardino pubblico, ove trovasi una piccola sezione zoologica. Conosciuto l'avvenimento a tempo, gli animali furono subito da me intercettati, e fu sin d'allora che mi accinsi alle prime prove. Da quell'epoca mi agitai, scrivendo nei paesi più noti per avere qualcuno di questi animali; e devo dire con ogni mia sorpresa che non mi fu tanto difficile d'averli, come io dapprima supponeva [1]. E infatti il lupo nei boschi della provincia di Catania è un animale tutt'altro che raro; anzi v'ha dippiù, nei boschi della provincia di Messina e Siracusa esso è comunissimo. Vi sono paesi in queste due provincie (come Melilli, Carlentini, Sanfratello, ecc.) i quali

[1] E mi sia permesso a questo punto di rendere pubblicamente i miei vivi ringraziamenti a quegli amici che mi fornirono del buon materiale e in specie all'Ill mo sig barone Riso di Carlentini, al sig. Zocco di Catania, e ai colleghi prof. De Luca, dott. Piazza, ecc. e al distaccamento militare di San Fratello che era disposto sempre a fornirmene, per le continue caccie che i militari fanno nei boschi di quel paesello.

sono ritenuti celebri fra noi per la quantità e frequenza dei lupi che vi si trovano, i quali animali spesso si avanzano fino alle porte dei villaggi in cerca di preda.

Però con tutto ciò non potei mai averne un numero tale da permettermi molte esperienze; infatti se qualche cosa mi addolora in queste ricerche è il fatto che benchè di lupi nel tutto io ne abbia avuto un discreto numero, pure il mio lavoro dovette essere sospeso e ripreso ad intervalli, a misura che il materiale difettava o aumentava; e quindi l'ho dovuto limitare sempre in un indirizzo modesto. Così il lavoro fu ripreso tre volte, ma ad ogni volta cercai sempre di completare una parte del piano di ricerche che mi proponeva. Ed è dopo parecchi anni dacchè cominciai, che soltanto oggi posso rendere di pubblica ragione i risultati ottenuti.

Colle mie esperienze io ho cercato di rispondere ai seguenti quesiti, allo scopo di colmare le maggiori lacune che vi sono intorno all'argomento:

1. Il virus di strada (virus di cane) e rispettivamente il virus fisso (virus di coniglio) come si comportano e quali modificazioni subiscono, passando attraverso l'organismo del lupo?

2. Il virus di strada e relativamente il virus fisso, come si comportano, quando passano successivamente in serie attraverso l'organismo di altri lupi?

3. Il virus di strada e rispettivamente il virus fisso, naturalizzati nel lupo, per una serie di inoculazioni successive attraverso l'organismo di questo animale, come si comportano quando essi vengono inoculati negli animali domestici, e specialmente nel cane e nel coniglio, ai quali appartenevano originariamente i virus?

4. Il virus degli animali domestici, morti rabbici per inoculazione di virus naturalizzato nel lupo, come si comporta passando attraverso animali della stessa specie?

5. Il virus di strada e rispettivamente il virus fisso, artificialmente attenuati, come si comportano in riguardo alla virulenza, passando attraverso l'organismo del lupo?

Soltanto con questi dati alla mano, ottenuti con l'esperimento e col controllo, noi potevamo portare un po' di luce in quel buio che ancora involge la questione; e così soltanto si potevano risolvere i dubbi che si hanno relativamente alla virulenza, alla incubazione, alla gravità del virus del lupo, e così infine si poteva contribuire alla miglior conoscenza della questione pratica, che in simili casi consiste tutta nel buon successo della cura.

Intanto, benchè la tecnica operativa e sperimentale è ben nota in

questo genere di ricerche e nei comuni animali da laboratario, pure non sarà del tutto inutile qualche accenno, trattandosi di animali come i lupi, niente affatto comuni nelle esperienze di laboratorio.

Anzi stimo utile cominciare da qualche notizia generale, relativa ai predetti animali d'esperimento.

Il lupo delle nostre contrade di Sicilia, parlo almeno per le tre provincie Catania, Messina, Siracusa, le quali mi fornirono il materiale, non diversifica gran fatto dal lupo delle altre contrade del mezzogiorno e nordiche. Il colore del pelame e la lunghezza di questo sono forse le note che più fanno differenziare questi animali da quelli delle altre regioni. Da noi il lupo è magro, ha le gambe svelte ed asciutte, la coda cadente e pelosa, la testa piuttosto grossa, il muso aguzzo, le orecchie piccole, dritte, corte, gli occhi grandi, biechi, mobili, feroci. Il suo pelame è piuttosto corto, molto ruvido, un po' più folto al collo ed alle cosce; il suo colore è molto lontano dal bianco, dal rosso, dal giallo o giallo più o meno fulvo, come si descrive per i lupi di altre regioni specialmente nordiche; da noi il lupo ha un pelame dal fulvo scuro al grigio cupo, con macchie nerastre a strisce alla faccia, al dorso, all'addome; le mucose esterne, specialmente delle guance, del muso e del palato sono macchiate di nero.

Il lupo piccolo di 6 a 8 settimane ha un pelame più chiaro, più rado e più fino, che poi facilmente gli cade, per rivestirsi del pelo fulvo grigio, ispido, corto, testè descritto.

Nessun'altra differenza degna di nota.

I lupi che furono soggetti all'esperimento avevano un'età che oscillava da 4 a 6, 7, 8 mesi; uno solo era di un anno; età però anche quella dei primi mesi che bastava a render temibili gli incorreggibili animali.

I lupi sono, come i cani, molto sensibili al cloroformio, e quindi per poterli operare bisognava adescarli col cibo entro un'apposita cassa di legno, la cui parte anteriore era mobile a sipario, e rappresentava la porta d'entrata. Per aprire o chiudere bisognava alzare o abbassare detta parete, facendola scorrere sul telaio a sfregamento.

Appena entrato l'animale si abbassava la porta d'entrata; e poi dall'alto della vôlta della cassa, munita di fori e di una finestrina centrale a vetri che s'apriva e chiudeva a piacere e che permetteva di vigilar l'animale, s'introduceva una spugna imbevuta di un miscuglio di etere e cloroformio. L'animale dapprima si dibatteva per un pezzo, ma finiva per cadere in anestesia Si profittava di questo momento per portar subito l'animale sul tavolo operatorio, si fissava al solito carpone, e sempre sotto la cauta narcosi di etere e cloroformio a parti eguali, si procedeva alla trapanazione, come per i cani, cioè incidendo la pelle della vôlta del cranio, scollando i tessuti, asportando col trapano un tassello di osso, fino a mettere allo scoperto la dura madre e facendo sotto la meninge la inoculazione dell'emulsione del virus rabbico. La vôlta del cranio nei lupi è durissima; le ossa

sono compatte, resistentissime, ma l'operazione decorre al solito senza difficoltà operatorie.

Si deve però badar bene a che l'animale non arrivi a ridestarsi durante l'atto operatorio, poichè le conseguenze, spesso non sempre nè tutte prevedibili, possono anche esser gravi; infatti l'animale che si sveglia dalla incompleta narcosi, e che resta in uno stato d'ebbrezza, si mostra inferocito talmente da rompere qualunque legatura e può riuscire financo mediante sforzi enormi a slegarsi, rendendo così impossibile affatto la continuazione dell'esperimento, e restando gli operatori esposti ulteriormente alla sua ferocia e a conseguenze anche gravi [1].

Riferiremo adesso brevemente le diverse serie di ricerche, limitandoci soltanto alla descrizione per esteso di qualche esperienza che poteva interessarci per lo studio accurato dello sviluppo e decorso della malattia del lupo.

SERIE PRIMA.

Inoculazione del virus di strada nel lupo.

Scopo di questa prima serie di esperienze era sopratutto quello di vedere il periodo d'incubazione, il decorso, la forma di rabbia, coi sintomi relativi, che si sarebbero sviluppati nel lupo per inoculazione del virus di strada.

2 giugno. Col midollo preso da un cane morto d'idrofobia, si fa emulsione che s'inocula, previa trapanazione, nella quantità di alcune gocce, 0,2-0,3 c. c. sotto la dura madre di due lupi. Nessun incidente operatorio.

Uguale inoculazione per trapanazione, con la stessa quantità di virus adoperata pei lupi, si fa in due cani, come controllo. E ciò per cercare di stabilire uguali condizioni di esperimento.

---

[1] Fu durante una di queste disgraziate esperienze che io andai incontro alla iattura di accidentale inoculazione di virus rabbico di lupo, fattami nel momentaneo trambusto della ferocia dell'animale che, ridestato dalla insufficiente narcosi, stava svincolandosi. Per la responsabilità di danni peggiori non potei badare immediatamente alla mia ferita; e quindi benchè il mio egregio Assistente, Dott. Migneco, l'avesse più tardi incisa per farla sanguinare e poi causticata, pure io stimai opportuno per ogni buon fine recarmi a Palermo per intraprendere in quell'Istituto antirabbico la cura Pasteur.

Anche l'inserviente andò incontro a parecchi morsi di qualcuno di questi animali, ma fortunatamente prima dello sviluppo dei sintomi rabbici o subito dopo l'operazione.

I. ESPERIENZA.

Lupo di 6 mesi, forte, robusto, di natura molto irrequieta.

2 giugno. Inoculazione per trapanazione. Svaniti i disturbi della narcosi l'animale si rimette al normale.

11 » Dal 2 al giorno 11 l'animale sta bene, non mostrando in apparenza alcun sintomo degno di nota.

12-13 » L'animale mostra un po' di cambiamento nel suo umore; si presenta dapprima un po' irrequieto e più tardi sempre più; gira per la gabbia senza posa, digrigna i denti, e s'avventa facilmente, specialmente se aizzato; ha gli occhi iniettati e qualche raro tremito del treno posteriore.

14 » I sintomi precedenti sono in aumento, le smanie crescono, i guaiti sono frequenti, da somigliare a veri ululati.

15 » L'irrequietezza è al massimo, l'animale va, viene, urta, s'avventa contro le pareti della gabbia, è in preda a grandi smanie. Addenta tutto con rabbia, e il cibo con voracità, ma viceversa poi non mangia che poco. È in preda ad una specie di misoneismo. La bocca è piena di bava, ed è sanguinolenta, perchè morde anche il ferro o la scodella ove gli si porge il cibo. A volte, come preso da stanchezza, cade e sta per un poco fermo; ma poi si rialza per ricominciare senza tregua a smaniarsi, a mordere, ad avventarsi. Gli occhi sono fortemente iniettati.

16 » Il lupo, oltre ai predetti fenomeni, presenta aumentati i tremiti delle membra posteriori, e il tremito pare diffuso anche alle membra anteriori; non coordina più bene il passo; se chiamato, sente; e se caduto si rialza ancora, ma con stento. In piedi si regge male, cammina a piccoli passi, vacillante, barcolla e cade spesso. La sua voce è trasformata; ulula come sofferente, rifiuta il cibo, ha la respirazione superficiale e frequente.
Verso sera i fenomeni predetti sono accentuatissimi.

17 » Il lupo si trova coricato sul fianco, come morto; tiene tutto il giorno quella posizione. Respira superficialmente, lentamente, spesso la respirazione è interrotta da atti inspiratorî profondi. Ha sempre bava sanguinolenta alla bocca; è assai denutrito; ha scosse tetaniche agli arti posteriori. L'occhio è semispento con cispo agli angoli palpebrali.

18 » Nelle ore antimeridiane l'animale è trovato morto; dura ancora la rigidità cadaverica; si desume sia morto nella notte del 17.
Durata in vita 15 giorni.

Autopsia. — L'animale è enormemente dimagrito. Le solite alterazioni anatomiche della rabbia: liquido viscido sanguinolento, nerastro, spumoso nella cavità dello stomaco, con pezzi di stoppa,

di legno, di penne di animali; un po' d'iperemia a chiazze limitata al duodeno e al crasso; reni, fegato, milza, fortemente congesti; trachea e grossi bronchi iperemici e pieni di spuma; polmoni congesti con macchie emorragiche diffuse ed ipostatiche alla base; dura meninge aderente alla volta cranica al punto di trapanazione; cervello iperemico e molto più la sostanza grigia di esso.

2ª Esperienza.

Lupo di 4 mesi, con istinti meno ribelli, si lascia avvicinare con familiarità dall'inserviente, che abitualmente gli somministra il cibo.

10 giugno. Dal 2 giugno, giorno dell'inoculazione, fino al 10, nulla di anormale, tranne un po' di depressione e di timidezza insolita e di guardatura sospetta.

11 » L'animale è preso da una certa irrequietezza, rifugge dalla sua cuccia, gira su e giù per la gabbia insolitamente; e mentre fino a ieri ci fidavamo di lui relativamente, oggi vediamo che s'avventa per un nonnulla contro tutti e contro tutto, compreso il recipiente ove gli si somministra il cibo; addenta infatti là scodella e rovescia il contenuto per terra e non ne mangia fino a che c'è qualcuno presente.

12-13 » L'animale è preso da strana irrequietezza che cresce sempre grandemente, addenta la gabbia morde furiosamente la sua catena, s'avventa contro il canile, emette lunghi ululati. A questi periodi succedono momenti di stanchezza e di tregua. Durante il giorno rosicchia una robusta doga della gabbia, mangia poco e digrignando. Si cominciano a marcare i crampi alle gambe e un certo inceppamento nei movimenti. Ha feci diarroiche. Gli occhi iniettati.

14 » L'animale è accovacciato; gli occhi gli luccicano e sono fortemente iniettati. Dal di fuori della gabbia, con bastoni si aizza per smuoverlo dalla cuccia. Esso s'avventa, ma tarda ad alzarsi e barcolla: ha paresi del treno posteriore. Ha bava sanguinolenta alla bocca e trisma. Alla sera i disturbi sono aggravati; l'animale non può più alzarsi; se stimolato, emette ululi. Mostra avventarsi, ma la sua testa ha delle scosse all'ingiù e cade di peso come se fosse a stento sorretta.

15 » L'animale si trova disteso sul fianco, in completo abbandono; ha la respirazione saccata a scosse, non reagisce più agli stimoli, neanche quando gli si reca dolore; ha scosse tetaniche agli arti. Muore nella notte.

Durata in vita 13 giorni.

Autopsia. — Animale dimagrito; mucosa delle labbra e lingua piena di abrasioni; stomaco pieno di roba indigesta, paglia, erba secca, crine, stoppie, fecce; intestini fortemente iperemizzati, con materiale poltaceo; fegato, milza, fortemente congesti; reni colla sostanza corticale in discreta degenerazione grassa. Nulla al torace, tranne un po' di edema e di congestione passiva alla base del polmone sinistro e qualche macchia emorragica; trachea e grossi bronchi con bava sanguinolenta; cuore in diastole. Nel cranio, ispessimento della dura meninge e aderenza alla scatola ossea. Iperemia delle pie meningi. Emorragie puntiformi in tutta la sostanza bianca e grigia del cervello.

3ª Esperienza.

Piccolo cane terrier.

2 giugno. Inoculazione endocranica del virus rabbico del cane predetto.
17 » Cominciano a manifestarsi i primi sintomi di rabbia nell'animale.
21 » Morte dell'animale in paralisi. — Durata in vita 19 giorni.

4ª Esperienza.

Cane razza bastarda.

2 giugno. Inoculazione endocranica del virus rabbico, nella quantità del cane della sopradetta esperienza.
19 » Comincia a manifestarsi un po' di debolezza agli arti dell'animale.
21 » Completo sviluppo dei fenomeni rabbici.
23 » L'animale è da jeri disteso sul fianco, e sembra morto, respira appena.
24 » Morte dell'animale. — Durata in vita 22 viorni.

Dalle predette esperienze risulta che il virus di strada inoculato al lupo gli conferisce una forma di rabbia furiosa, quasi analoga alla rabbia furiosa del cane; se non che i fenomeni di eccitazione nel lupo decorrono con maggior gravità. Il periodo d'incubazione è di circa 8-10 giorni, e la morte sopravviene fra 13-15 giorni.

Questi dati, confrontati con l'ordinario periodo d'incubazione e di vita del cane, si mostrano più brevi e certamente più gravi. E tenuta presente la variabile intensità del virus di strada, noi abbiamo voluto apposta aver l'appoggio delle esperienze predette di controllo nei cani, nei quali a parità di condizione, il periodo d'incubazione è durato 14-17 giorni e la morte è sopravvenuta dopo 19-22 giorni.

Ciò ci conferma sempre più nel fatto, che il virus di strada, attraverso l'organismo del lupo, si è un pò' rinforzato nella sua virulenza, per la relativa brevità del periodo d'incubazione e per la precocità della morte dell'animale.

SERIE SECONDA.

Comportamento del virus di strada nei passaggi successivi attraverso l'organismo del lupo.

In questa seconda serie di ricerche ci proponevamo di vedere se e quali ulteriori modificazioni di attenuamento o di rinforzamento può subire il virus rabbico, passando successivamente da lupo a lupo, per poi rispettivamente vedere le relative modificazioni del decorso della malattia, della durata dell'incubazione, etc. E ciò naturalmente ha una certa importanza, poichè i risultati avrebbero potuto portare un po' di luce sullo sviluppo delle epizoozie rabbiche in questi animali.

Col midollo del primo lupo, morto di rabbia dopo 15 giorni, per la inoculazione del virus di strada, si fa emulsione e s'inocula per trapanazione un secondo lupo; la quantità di virus inoculata è di 0.2 c. c.

1ª Esperienza,

Lupetto di circa 4 mesi, non molto riottoso, ma abbastanza temibile, soltanto remissivo con l'inserviente che gli somministra cibo ed altre cure.

20 giugno. Trapanazione ed inoculazione del virus predetto.

21-22 » L'animale sta bene, mangia con la solita voracità, è allegro, svelto, del solito umore.

23-24-25 » L'animale non mostra la sua fisonomia abituale, sembra un po' depresso, giace volentieri nella sua cuccia, ma non può dirsi che accusi disturbi apparenti speciali. Conserva il solito appetito, ma manca della prima vivacità e fierezza; è piuttosto buono e mite.

26 » Il lupo presenta dei crampi appena apprezzabili agli arti anteriori, posteriori e alla testa, tuttavia mangia, ma non più colla consueta voracità; ama molto la sua cuccia, non è irrequieto nè irritato; se si eccita però reagisce.

27 » Aumenta l'incoordinazione dei movimenti degli arti anteriori e posteriori. La sua fisonomia ha preso un rabbonimento speciale; se si chiama è propenso ad avvicinarsi, ma cam-

mina vacilloni e traballante. Mangia poco. Verso sera i tremiti si diffondono al corpo e al capo che si mostra penzoloni, e le scosse cloniche toniche degli arti sono in aumento.

28 giugno. Il lupo giace disteso sul fianco in perfetta paralisi; la sua respirazione è leggiera e superficiale; benchè coricato, lambe la scodella del brodo e riesce malamente a deglutirne qualche sorso. Arriva a volte ad addentare un pezzetto di carne, ma esso gli si sofferma in bocca, perchè egli è incapace a masticare e a deglutire; sente ancora se è chiamato, ma si mostra incapace a qualunque movimento.

29 » Giace tuttora nella posizione di ieri, ma in condizioni molto peggiorate. Respiro brevissimo, bava alla bocca, insensibilità agli stimoli, occhi semispenti con muco-pus agli angoli palpebrali. Muore alle ore 2 pom.

Autopsia — Nessuna lesione importante oltre le comuni note anatomiche della rabbia; anzi i fatti d'iperemia al cervello e agli altri organi non sono così imponenti come negli animali precedenti.

2ª Esperienza.

Lupo di 4 mesi e mezzo, mite e familiare.

Col midollo del predetto lupo, morto dopo 9 giorni dall'inoculazione si fa emulsione, e con essa s'inocula per trapanazione un altro lupo dell'età accennata; quest'animale ha istinti piuttosto miti; durante la sua dimora in Laboratorio ha mostrato una certa familiarità e dimestichezza.

1° luglio. Trapanazione e inoculazione di 0,2 c c di emulsione.

2-3-4-5 » L'animale mostra di stare apparentemente bene, un po' più obbediente del solito e un po' meno vivace.

6 » L'animale mangia a riprese, e non con la voracità di prima; dopo alcuni bocconi, pei quali mostra grande avidità, smette e va ad accovacciarsi. Ripete ad ogni pasto lo stesso fatto. Ama stare nella sua cuccia; ogni tanto è preso da lunghi brividi che si estendono sino alla testa. Se si tira fuori dalla sua cuccia, cammina come se avesse debolezza alle gambe; non c'è ancora un vero incoordinamento di movimenti. Si mostra piuttosto assai spaventato.

7 » Si accentua rapidamente la paralisi degli arti posteriori; se l'animale vien costretto a camminare, cade, non si regge più sulle gambe; pare che conservi ancora il senso della fame, poichè si avventa sul cibo, cerca masticarlo, ma lo rigetta subito appena tenta deglutirlo.

8 » La paralisi è completa e forte, l'animale giace sul fianco, respira

superficialmente e lentamente, emette bava dalla bocca, non risponde più agli stimoli, anche dolorosi. Le congiuntive oculari sono iniettate.

9 luglio L'animale si mostra in condizioni ancora più aggravate di ieri, e muore nelle ore meridiane.

Autopsia. — Pochissime lesioni apprezzabili al reperto macroscopico; bocca, faringe iperemizzate, stomaco pieno di spuma sanguinolenta e di liquido grigiastro con detriti alimentari indigesti; intestini piuttosto iperemici; fegato, milza, reni congesti. Edema leggero al polmone sinistro e stasi alla base di esso; molta schiuma nella trachea. Iperemia nella meningi e nella sostanza cerebrale.

3ª Esperienza.

Lupo dell'età di 5 mesi, di umore abbastanza vivace e d'istinti non molto benigni.

Col midollo del sopradetto lupo, morto in ottava giornata dall'inoculazione, si fa emulsione, e con essa s'inocula un altro lupo.

11 luglio. Trapanazione ed inoculazione di 0,2 c. c. di virus.

12-13-14-15 L'animale si mostra di apparente benessere, mangia colla solita voracità, è sempre vivace e conserva ancora i suoi istinti ribelli.

16-17 » L'umore del lupo sembra cambiato, comincia in esso un po' di irrequietezza; nel camminare si nota un po' d'incertezza e spesso le gambe posteriori gli vengono meno.

18 » Incoordinazione manifesta dei movimenti, e verso sera la paralisi del treno posteriore è avanzata; l'animale preferisce stare nella sua nicchia, impossibilitato a muoversi; rifiuta il cibo; respira superficialmente, risponde ancora poco agli stimoli, ed emette ululi deboli se gli si fa dolore.

19 » Continua nelle condizioni di ieri ma più aggravate. — Muore nelle ore pomeridiane.

Autopsia. — Reperto simile ai precedenti, nessuna lesione degna di nota, oltre le comuni accennate.

Benchè le esperienze accennate siano poche, pure non si può fare a meno di restare impressionati dei risultati ottenuti. E se teniamo anche conto del risultato delle esperienze della prima serie, in cui il virus di strada, dopo un solo passaggio attraverso l'organismo del lupo, subiva un certo rinforzamento nella sua virulenza, dobbiamo ora convenire come nei successivi passaggi nel lupo, questo rinforzamento fu

notevolissimo e rapido. Il virus di strada ammazza il lupo in 13–15 giorni conferendogli la rabbia furiosa; il virus di questo lupo ammazza un secondo lupo in 9 giorni, il virus di questo secondo ammazza un terzo lupo in 8 giorni, e il virus di questo terzo ammazza un quarto lupo ugualmente in 8 giorni, e tutti muoiono di rabbia paralitica.

Ciò ci fa rilevare come l'esaltamento di virulenza del virus di strada attraverso il lupo non è graduale, ma raggiunge tosto, dopo 1–2 passaggi una virulenza costante che è di 8 giorni. Non possiamo certamente dire, a causa della mancanza di altre esperienze, se questa virulenza venga ad esaltarsi ulteriormente, nei successivi passaggi in altri lupi; ma il fatto che fin dal secondo passaggio la durata in vita scende a 9 giorni per andare a 8 e mantenersi costante nei successivi passaggi, ci può far credere che se forse un rinforzamento di virus ci potrà ancora ulteriormente essere, questo dovrà essere tale da andare poco al di sotto degli 8 giorni.

Così il virus di strada acquista, attraversando l'organismo del lupo, quella virulenza quasi fissa, che nel coniglio si ottiene dopo molti passaggi (50-100).

Non meno importante è il periodo d'incubazione che è brevissimo, oscillante tra 4-5 giorni, e tale da uguagliare il periodo d'inoculazione dei conigli inoculati con virus fisso. Come altresì degna di studio ci pare la mancanza dei sintomi di vera rabbia furiosa in tali animali; si è notato invero in essi un po' di irrequietezza, ma questa non ha avuto nulla a che fare con l'enorme e terribile eccitamento che presentarono i primi due lupi inoculati con virus di strada direttamente. Osiamo ammettere che questi ultimi lupi abbiano presentato la forma paralitica della rabbia analogamente a quanto avviene d'ordinario negli animali inoculati con virus fisso. Non possiamo intanto emettere ulteriori giudizi sulla persistenza o cambiamento di tale forma, non essendo stati possibili ulteriori esperimenti.

SERIE TERZA.

Comportamento negli animali domestici del virus di strada, dopo i successivi passaggi attraverso il lupo.

Lo studio di questa questione ci parve di una certa importanza pratica, poichè il lupo nello sviluppo della sua rabbia può morsicare, oltre gli animali selvaggi della sua specie e del suo genere (sciacallo, jena, volpe, ecc.) anche altri animali che convivono con l'uomo, sui

quali del resto manifesta più facilmente la sua ferocia (greggi, armenti, ecc,), senza parlare dei comuni animali, come i cani, contro i quali i lupi hanno odio istintivo grandissimo, e di altri animali ancora, come i gatti, i conigli e gli animali da cortile in genere, che in un modo o in un altro possono aver avuto trasmesso il virus dal lupo.

Era quindi naturale di conoscere il destino di questi animali, o almeno di quelli che sono più alla mano nei nostri laboratorî, per vedere come essi si comportassero nello sviluppo della malattia in rapporto alla incubazione, ai sintomi, alla forma di questi, alla durata, ecc.

Oltre a ciò l' inoculazione in questi animali, in cui è ben noto l'andamento del virus di strada genuino, ci poteva fornire altri criterî sulle modificazioni subìte dal predetto virus, passato attraverso l'organismo dei lupi.

Non staremo a riferire tutte le esperienze per disteso, preferendo per la loro uniformità di raggrupparle in tabelle, ritenendo eziandio inutile di ricordare che col virus di strada fu inoculato soltanto il primo lupo, e gli altri lupi col virus del lupo di serie, cioè morto in precedenza.

Gli animali adoperati sono stati cani, conigli, gatti, cavie, non comportando i mezzi dell' Istituto di estendere le ricerche sugli altri animali, come gli ovini, bovini, ecc.

L' inoculazione è stata fatta sub-durale. Abbiamo però tenuto conto del peso degli animali che è stato in media per i conigli di gr. 1200 a 1500, per i cani di kg. 5 a 7, per i gatti di gr. 900 a 1200, per le cavie di gr. 400 a 600.

Inoculazione col virus rabbico del 1° lupo.

(Vedi Serie I — Esper. 1ª).

ANIMALE d'esperimento	GIORNO della inoculazione	GIORNO in cui subentrano sintomi di paralisi	GIORNO della morte	DURATA dello esperimento
Coniglio	20 giugno	26 giugno	29 giugno	9 giorni
Coniglio	20 »	25 »	30 »	10 »
Cane	20 »	28 »	1 luglio	11 »
Cane	20 »	27 »	30 giugno	10 »
Gatto	20 »	26 »	30 »	10 »
Gatto	21 »	27 »	30 »	9 »
Cavia	20 »	28 »	30 »	10 »
Cavia	21 »	27 »	30 »	9 »

Inoculazione col virus rabbico del 2° lupo.

(Vedi Serie II — Esper. 1ª).

ANIMALE d'esperimento	GIORNO della inoculazione	GIORNO in cui subentra la paralisi	GIORNO della morte	DURATA dello esperimento
Coniglio	1 luglio	7 luglio	9 luglio	8 giorni
Coniglio	1 »	6 »	9 »	8 »
Cane	2 »	5 »	9 »	7 »
Cane	2 »	6 »	10 »	8 »
Gatto	1 »	5 »	8 »	7 »
Gatto	1 »	6 »	8 »	7 »
Cavia	2 »	8 »	10 »	8 »
Cavia	2 »	8 »	9 »	7 »

Inoculazione col virus rabbico del 3° lupo,

(Vedi Serie II — Esper. 2ª).

Coniglio	12 luglio	16 luglio	19 luglio	7 giorni
Coniglio	12 »	17 »	19 »	7 »
Cane	13 »	17 »	20 »	7 »
Cane	13 »	18 »	20 »	7 »
Gatto	13 »	18 »	20 »	7 »
Gatto	13 »	17 »	19 »	6 1/2 »
Cavia	12 »	16 »	19 »	7 »
Cavia	12 »	17 »	19 »	7 »

Inoculazione col virus rabbico del 4° lupo.

(Vedi Serie II — Esper. 3ª).

Coniglio	21 luglio	26 luglio	28 luglio	7 giorni
Coniglio	21 »	25 »	28 »	7 »
Cane	21 »	25 »	28 »	7 »
Cane	21 »	26 »	28 »	7 »
Gatto	22 »	26 »	28 »	6 »
Gatto	22 »	25 »	28 »	6 »
Cavia	22 »	25 »	28 »	6 »
Cavia	22 »	27 »	28 »	6 »

Per aver meglio sottocchio i risultati finali dell'esito dei diversi animali, a seconda i passaggi del virus di strada nei diversi lupi, raggrupperemo quelli nella seguente tabella:

Durata di vita in giorni degli animali inoculati con virus

ANIMALI	del 1º lupo	del 2º lupo	del 3º lupo	del 4º lupo
Conigli	9-10 giorni	8 giorni	7 giorni	7 giorni
Cani	10-11 »	7-8 »	7 »	7 »
Gatti	9-10 »	7 »	6-7 »	6 »
Cavie	9-10 »	7-8 »	7 »	6 »

I risultati rassegnati nelle singole tabelle e raggruppati qui sopra in succinto ci fanno pervenire a considerazioni di qualche interesse. Resta intanto assodato come fatto fondamentale che gli animali domestici in seguito alla inoculazione del virus di strada che ha attraversato l'organismo del lupo, soccombono alla rabbia molto più rapidamente di quando vengono inoculati col solito virus di strada.

Come resta del pari assodato, che quanto più il virus di strada si è rinforzato per successivi passaggi nell'organismo del lupo, tanto più rapidamente produce la morte negli animali, fino ad arrivare un limite di tempo quasi costante, che è paragonabile a quello impiegato dal virus fisso di coniglio, per produrre in alcuni di essi lo sviluppo della malattia. E dico in alcuni di essi perchè i cani, per esempio, inoculati con virus di strada, rinforzato attraverso il lupo anche per uno o due passaggi, muoiono assai più rapidamente di quando vengono inoculati con virus fisso di coniglio. Infatti al terzo, al quarto passaggio la virulenza è tale che i cani soccombono alla rabbia in 7 giorni, analogamente ai conigli per via del virus fisso. È bene intanto notare che il virus di strada al terzo o al quarto passaggio del lupo, mostra nel cane una virulenza costante, come si verifica per l'innesto nel lupo che poi rimaneva quasi stazionario ad 8 giorni.

Per tutti gli altri animali, conigli, cavie, gatti, abbiamo il fatto costante ed importante che fin dal secondo passaggio nel lupo, il virus di strada si comporta nella sua virulenza rinforzato come il virus fisso del coniglio, poichè i predetti animali soccombono in seguito alla inoculazione in un periodo di tempo oscillante fra 6-7 giorni.

Si può dunque ammettere che il virus di strada, passando attraverso l'organismo del lupo, si esalta nella sua virulenza, acquistando le proprietà del virus fisso del coniglio e comportandosi nel cane con una virulenza maggiore che negli altri animali, e propriamente con la stessa gradazione di virulenza che nel lupo, come se il cane continuasse la serie di passaggio del lupo istesso.

La morte di tutti gli animali è avvenuta per rabbia paralitica.

SERIE QUARTA.

Comportamento del virus degli animali morti rabbici per inoculazione del virus di lupo, in animali della stessa specie.

Rimaneva intanto ancora a sapersi quale forza avesse il virus degli animali morti rabbici per inoculazione di virus di strada rinforzato attraverso il lupo; cioè se la virulenza del midollo di questi animali sí mantenesse uguale o no a quella posseduta dal virus con cui vennero in precedenza inoculati, potendosi ben dare il caso che un dato animale (coniglio p. es.), inoculato con virus rinforzato attraverso il lupo, fosse morto in un breve periodo di tempo, ma che poi esso stesso o meglio il suo virus inoculato ad animali della stessa specie non fosse più capace di mantenere costante la virulenza di quel virus che lo fece in un dato periodo di tempo soccombere. In altri termini bisognava sapere se il virus di strada, rinforzato attraverso il lupo, e che concedeva una durata di vita relativamente corta agli animali cui si inoculava, si modificasse poi nella sua virulenza, quando dai predetti animali venisse passato in altri della stessa specie.

Le esperienze su questo indirizzo, essendo poche, possono aggrupparsi nella seguente tabella. Ho scelto gli animali, morti in seguito all'inoculazione del virus di strada, passato attraverso il primo lupo e quelli morti in seguito all'inoculazione del virus di strada, passato per ben 4 passaggi nel lupo. Così le differenze erano meglio apprezzabili.

Per meglio intendere la tabella aggiungiamo che col virus di strada proveniente dal passaggio del 1° lupo s'inoculava un primo coniglio col virus di questo un 2° coniglio, col virus di questo un 3° coniglio e così via. Per gli altri animali si praticava altrettanto; s'inoculava sempre il primo animale col solito virus del 1° lupo e gli altri animali con il virus di quello morto in precedenza.

La inoculazione veniva sempre fatta per trapanazione.

TAB. I.

Virus di strada dopo il solo 1° passaggio nel lupo.

Numero dei passaggi	ANIMALE d' esperimento	GIORNO della inoculazione	GIORNO in cui subentrano sintomi di paralisi	GIORNO della morte	DURATA dello esperimento
I	Coniglio	20 giugno	26 giugno	29 giugno	9 giorni
II	Id.	1 luglio	9 luglio	11 luglio	10 »
III	Id.	12 »	21 »	23 »	11 »
IV	Id.	25 »	1 agosto	3 agosto	9 »
V	Id.	3 agosto	10 »	13 »	10 »
VI	Id.	14 »	21 »	23 »	9 »
I	Cane	20 giugno	28 giugno	1 luglio	11 »
II	Id.	1 luglio	10 luglio	13 »	12 »
III	Id.	14 »	22 »	24 »	10 »
I	Gatto	20 giugno	26 giugno	30 giugno	10 »
II	Id.	1 luglio	8 luglio	10 luglio	9 »
III	Id.	11 »	18 »	20 »	9 »
IV	Id.	20 »	27 »	29 »	9 »
V	Id.	30 »	6 agosto	7 agosto	8 »
I	Cavia	20 giugno	28 giugno	30 giugno	10 »
II	Id.	1 luglio	7 luglio	10 luglio	9 »
III	Id.	10 »	15 »	17 »	7 »
IV	Id.	17 »	23 »	25 »	8 »

TAB. II.

Virus di strada dopo il 4° passaggio nel lupo.

Numero dei passaggi	ANIMALE d' esperimento	GIORNO della inoculazione	GIORNO in cui subentrano sintomi di paralisi	GIORNO della morte	DURATA dello esperimento
I	Coniglio	21 luglio	26 luglio	28 luglio	7 giorni
II	Id.	28 »	2 agosto	4 agosto	7 »
III	Id.	4 agosto	8 »	10 »	6 »
IV	Id	11 »	16 »	18 »	7 »
V	Id.	18 »	24 »	25 »	7 »
VI	Id.	25 »	30 »	31 »	6 »
I	Cane	21 luglio	25 luglio	28 luglio	7 »
II	Id.	28 »	2 agosto	4 agosto	7 »
III	Id.	4 agosto	9 »	12 »	8 »
IV	Id.	13 »	18 »	20 »	7 »
I	Gatto	22 luglio	26 luglio	28 luglio	6 »
II	Id.	28 »	1 agosto	3 agosto	6 »
III	Id.	3 agosto	8 »	10 »	7 »
IV	Id.	10 »	14 »	15 »	5 »
V	Id.	15 »	19 »	21 »	6 »
VI	Id.	21 »	—	22 »	1 giorno
I	Cavia	22 luglio	25 luglio	28 luglio	6 giorni
II	Id.	28 »	2 agosto	4 agosto	7 »
III	Id.	4 agosto	8 »	10 »	6 »
IV	Id.	10 »	—	13 »	3 »

I risultati generali delle due esposte tabelle si possono compendiare brevemente per la loro uniformità.

Nella 1ª tabella (1° passaggio nel lupo) abbiamo che il virus di strada, rinforzato attraverso l'organismo del lupo uccide, come anche prima s'è visto, gli animali, conigli, cani, gatti e cavie in un periodo di tempo che è più corto di quello impiegato dall'ordinario virus di strada, e che questo rinforzamento nella virulenza si mantiene costante attraverso i successivi passaggi nelle singole specie animali. Anzi, quando il virus di strada non ha raggiunto, attraverso il passaggio nel lupo, il suo massimo di virulenza, inoculato negli animali segue, coi successivi passaggi in questi, la legge naturale del suo ulteriore rinforzo, quando ben inteso, la specie animale si presta; (conigli, gatti, cavie); per i cani invece la virulenza si mantiene in quel grado di rinforzamento cui è stato elevato dal passaggio subìto attraverso il lupo.

Nella 2ª tabella (4° passaggio nel lupo) dove il virus di strada è passato successivamente attraverso 4 lupi, raggiungendo quasi il massimo di virulenza, noi vediamo che il virus così rinforzato uccide gli animali in un periodo di tempo relativamente corto, paragonabile a quello del virus fisso di coniglio. Tale virulenza si mantiene ancora costante nei successivi passaggi attraverso le diverse specie animali, e anche nei cani il cui organismo non sarebbe naturalmente favorevole (Celli, Marino-Zuco).

Adunque le specie animali, alle quali viene inoculato un virus di strada, rinforzato attraverso uno o più passaggi nel lupo, mantengono costantemente o favoriscono coi successivi passaggi alle singole specie quel grado di virulenza che portava originariamente il virus a seconda il rinforzo subito.

SERIE QUINTA.

Comportamento nel lupo del virus di strada attenuato.

Era infine importante pel nostro studio di vedere come si comporta l'organismo del lupo per il virus di strada attenuato. Accade spesso che animali rabbici possono trasmettere l'infezione ad animali poco suscettibili e che possano attenuare il virus. Ma quando il virus è naturalmente o artificialmente attenuato, si mantiene sempre tale, oppure si esalta passando attraverso il lupo; e in questo caso qual n'è la differenza di fronte agli altri animali?

ESPERIENZA 1ª.

Circa 5 grammi di midollo tolto da cane rabbico (virus di strada) si diluiscono in acqua distillata, sterilizzata e l'emulsione si tiene in stufa a 35° per 50 ore. Dopo tal tempo le particelle del midollo si trovano in fondo al tubo, lasciando la parte superiore del liquido quasi rossastra e piuttosto limpida. Si agita bene il tutto, si filtra a un pannolino di lino e s'inietta in un lupo, in un cane, in un coniglio. L'inoculazione in tutti e tre gli animali è subdurale. La quantità inoculata è di 0,2 cc. pel lupo e pel cane, di 0,1 cc. pel coniglio.

I risultati sono i seguenti:

I. *Lupo piccolo di 5 mesi, addomesticato in Laboratorio da circa due mesi.*

20 maggio. Inoculazione dell'animale.
2 giugno. Cambiamento d'umore e irrequietezza.
5 » Paralisi
9 » Morte.
L'animale visse 20 giorni.

II. *Cane piccolo.*

20 maggio. Inoculazione.
25 giugno. Cambiamento d'umore e irrequietezza.
27 » Paralisi.
29 » Morte.
L'animale visse 40 giorni.

III. *Coniglio di media taglia.*

21 maggio. Inoculazione.
19 giugno. Paralisi.
22 » Morte.
L'animale visse 31 giorni.

ESPERIENZA 2ª.

Col midollo del 1° lupo vissuto 20 giorni, morto nella predetta esperienza si fa inoculazione per trapanazione in 2° lupo.

I. *Lupo piccolo di 4 mesi, relativamente mansueto.*

9 giugno. Inoculazione.
15 » Cambiamento d'umore e irrequietezza.
17 » Paralisi.
19 » Morte.
L'animale visse 10 giorni.

II. *Cane di media taglia.*

Viene inoculato con emulsione di midollo del 1° cane morto il 29 giugno e vissuto 40 giorni.
30 giugno. Inoculazione per trapanazione.
31 luglio. Comparsa dei primi sintomi.
3 agosto. Paralisi.
5 » Morte.
L'animale muore dopo 39 giorni.

III. *Coniglio di media taglia.*

Col cervello del 1° coniglio morto il 22 giugno e vissuto 31 giorni si fa il
28 giugno. Inoculazione per trapanazione.
10 luglio. Comparsa dei primi sintomi.
12 luglio. Paralisi.
13 » Morte.
L'animale muore dopo 22 giorni.

Come si vede dalle precedenti esperienze con la inoculazione di virus di strada attenuato, la durata di vita nel 1° cane fu di 40 giorni, nel 2° fu di 39 giorni; nel 1° coniglio fu di 31 giorni, nel 2° fu di 22 giorni; nel 1° lupo invece fu di 20 giorni, nel 2° fu di 10 giorni.

Per mancanza di altri lupi non si proseguì l'esperimento, ma pur tuttavia i due dati accennati dimostrano che il virus di strada attenuato artificialmente, passando attraverso l'organismo del lupo, si rende già molto rinforzato fin dal primo passaggio, tanto che al 2° passaggio si è avvicinato nella sua virulenza al periodo stabile del virus fisso.

Gli altri animali invece, cane, coniglio non mostrano nulla di così spiccato.

SERIE SESTA.

Inoculazione del virus fisso nel lupo.

Dopo quanto si era sperimentato a proposito del virus di strada, non meno importante si presentava allo studio la questione della durata d'incubazione e del modo di svolgersi della rabbia nel lupo, in seguito all'inculazione del virus fisso.

Infatti col midollo di un coniglio di serie si fa emulsione e s'inoculano per trapanazione due lupi.

Esperienza 1ª.

Lupo di 5 mesi abbastanza riottoso, forte.

26 maggio	Inoculazione di c.c. 0,2 — Dopo l'operazione il lupo mangia con la solita voracità e nulla dimostra di aver risentito dell'atto operatorio.
27, 28, 29	L'animale mangia col solito appetito vorace; manifesta sempre l'indole sua aggressiva, ma non mostra nulla di anormale.
30 »	L'animale mangia meno di prima; si cominciano a notare piccoli tremiti all'arto posteriore sinistro e qualche crampo al destro; il suo umore è però meno vivace.
31 »	L'animale si è trovato giacente sul fianco con paralisi progredita del treno posteriore; sorregge anche a stento la testa, ha ancora ansia di mangiare ma non deglutisce. Non grida, non emette ululati.
1 giugno.	Continua la paralisi: l'animale si mostra più abbattuto, ha crampi forti agli arti posteriori; respira superficialmente e a volte a scosse; ha bava alla bocca, e verso sera non reagisce più a nessun stimolo.
2 »	L'animale vive ancora, respira appena, muore nelle ore p. m.

Autopsia - Reperto anatomico senza alcun segno di rilievo; le solite note di iperemia più o meno intensa al cervello e al midollo, e congestione agli organi interni.

Esperienza 2.ª

Lupo di circa 6 mesi molto ribelle.

26 maggio. Inoculazione di cc. 0, 3 di emulsione del midollo predetto.

27, 28, 29 L'animale dopo l'atto operativo è rimasto molto avvilito e pauroso, guarda con occhi biechi, ma senza intendimenti ostili; non è più vivace come prima ed ha piuttosto paura nel veder persone avanti la gabbia; mangia discretamente ma quando è solo; ama restar rincantucciato.

30 » Non è facile notare, stando esso sempre nella cuccia, gli ulteriori disturbi dell'animale. Tirato fuori, si mostra restio a camminare, e in qualche passo tiene sospesa la zampa posteriore sinistra. È preso spesso da brividi generali o da stanchezza, per cui si accovaccia sempre.

31 » S'inizia la paralisi degli arti posteriori; l'animale rifiuta il cibo e ha diarrea; ha i fianchi molto magri: se si stimola, anzichè avventarsi, dimostra sempre più la sua paura, rannicchiandosi e piegando la testa.

1° giugno. Giace disteso sul fianco, preso da crampi agli arti; ha la bocca piena di bava e la lingua sporgente; ad ogni urto circostante o a ogni rumore si ripetono le scosse clonico-toniche degli arti; respira superficialmente e acceleratamente.

2 » Si trova nelle condizioni di ieri più gravi; è insensibile a qualunque stimolo, muore alle ore 11.

Autopsia — Nulla di rilevante, tranne le solite e comuni note anatomiche descritte.

Le due esperienze accennate ci sembrano importanti per le considerazioni a cui fanno pervenire. Si nota infatti che il virus fisso trasmette al lupo la rabbia con tutti i sintomi della forma paralitica e con un periodo d' incubazione brevissimo, corrispondente a quello dei conigli inoculati con virus fisso. Se si paragona questo risultato con quanto avviene nei cani inoculati con virus fisso, i quali hanno un periodo d' incubazione superiore agli 8–10 giorni e una durata di vita quasi ordinariamente più lunga dei 10-12 giorni, non si può fare a meno di concludere che l'organismo del lupo di fronte al virus fisso si comporta come l'organismo del coniglio, e in via generale riconfermare quanto s'era assodato pel virus di strada, cioè che il lupo è per il virus rabbico un organismo assai più recettivo del cane e simile al coniglio.

SERIE SETTIMA.

Comportamento del virus fisso nei passaggi successivi attraverso l'organismo del lupo.

Essendo il lupo un animale molto recettivo all' infezione rabbica, nasceva naturale la domanda, se il virus fisso, dopo il primo passaggio nel lupo, attraversando ulteriormente l'organismo di altri lupi, mantenesse costante la virulenza spiegata nel primo, o invece subisse delle attenuazioni o piuttosto un rinforzamento.

Poteva infatti darsi che il lupo facesse pel virus fisso quello che il coniglio fa pel virus di strada, riducendone cioè sempre più corto il periodo di incubazione; come poteva del resto darsi benissimo il caso contrario, cioè, che il virus fisso, termine ultimo di virulenza del virus rabbico, (almeno per quanto finora ci è noto) attraversando un organismo diverso, benche recettivo, poteva regredire nella virulenza. Erano necessarî degli esperimenti.

Esperienza 1ª.

Lupo di 6 mesi, molto riottoso e vivace.

Col midollo del primo lupo, morto per inoculazione del virus fisso in 7 giorni, si fa emulsione e s' inocula per trapanazione un 2° lupo; la quantità di virus inoculata è di 0, 3 cc.

3 giugno. Trapanazione ed inoculazione.

4-5 » L'animale non manifesta alcun segno di sofferenza; mangia col solito appetito: guarda bieco e diffidente.

6 » L'animale ha istinto di mangiare, s'avventa contro il cibo, ma poi mangia poco, sta spesso rincantucciato nella sua cuccia, pare d'umore tetro ed evidentemente cambiato.

7 » I tremiti agli arti posteriori sono visibili, l'animale cammina. ma cogli arti inflessibili come irrigiditi; mangia poco, è tetro e ama stare rannicchiato.

8 » I movimenti sono incoordinati, l'animale si regge poco; mangia quasi nulla di cibo solido, beve un poco di brodo, sembra avere paralisi al faringe.

9 » L'animale è trovato disteso sul fianco in perfetta paralisi, ha schiuma viscidosa alla bocca. Da ieri il suo cibo è intatto nella scodella. Non reagisce che poco agli stimoli, ha crampi agli arti posteriori.

10 giugno L'animale continua nello stato precedente, è immobile e sembrerebbe morto, se non fosse il respiro lievissimo e a volte saccato che fa vedere che esso è ancora in vita. Muore nelle ore di sera.

Autopsia — Meningi e cervello poco iperemici; polmoni, enfisematici con congestione passiva alla base; stomaco ed intestini pieni di materiale liquido giallastro, viscidoso; fegato, reni milza, congesti.

ESPERIENZA 2ª.

Lupo di 1 anno, forte, vigoroso e discretamente riottoso.

11 giugno. Con emulsione di midollo del 2° lupo s'inocula per trapanazione un 3' lupo.

12-13-14 » L'animale è rimasto un po' depresso dopo l'operazione; ma per altro mangia a divorare e s'avventa facilmente, ha lo sguardo bieco e ringhia, quando lo si avvicina con qualche bastone in mano, o quando lo si eccita.

15 » L'animale si mostra sempre più depresso; sta volentieri nel suo giaciglio, non mangia in presenza di persona, ma vuota la scodella quando è solo. Si nota qualche tremito fugace agli arti posteriori ed anteriori. Quando cammina si osserva meglio che le gambe non conservano la loro perfetta funzionalità

16 » Mancanza d'appetito, rifiuta il cibo, incoordinazione di movimenti, grande stanchezza, poca reazione agli stimoli.

17 » L'animale si trova in paralisi, ha spuma alla bocca, gli occhi pieni di muco e socchiusi, respira a stento. Paralisi degli sfinteri.

18 » Muore nelle ore di mattina.

Autopsia — Le stesse note anatomiche degli animali precedenti.

ESPERIENZA 3ª.

Lupo dell'età di cinque mesi, abbastanza vivace.

19 giugno. Con emulsione del midollo del 3° lupo s'inocula un 4° lupo.

20-21-22 » L'animale non mostra alcuna sofferenza; appare normale.

23 » L'arto posteriore sinistro è in preda a crampi; l'animale si mostra un po' stordito, ma gironzola per la gabbia e conserva ancora il suo buon appetito.

24 » I crampi dell'arto sinistro si estendono al destro; l'animale non coordina bene i suoi movimenti, fa fatica a stare sulle gambe, mangia poco o nulla, sta rincantucciato.

25 giugno L'animale è in paralisi, respira affannosamente, ha spuma giallo-verde alla bocca.
26 » È trovato morto.

Autopsia — Lesioni anatomiche di poca entità, un po' di iperemia alle meningi, al cervello, agli organi addominali. Stomaco ed intestini pieni di materiale nerastro, come melena.

Le esperienze predette lasciano venire alla conclusione generale che il virus fisso nei successivi passaggi attraverso l'organismo del lupo, mantiene costante la sua virulenza. Ciò che di conseguenza fa ammettere che l'organismo del lupo nella trasmissione della viurlenza si comporta analogamente all'organismo del coniglio.

È bensì vero che dati i pochi passaggi non si potrebbe assicurare in via assoluta che il virus fisso non possa ulteriormente modificarsi. Ma in via d'induzione noi dobbiamo credere che la virulenza del virus rabbico fisso, attraverso il lupo debba mantenersi costante, dopo quanto abbiamo visto avvenire per il virus di strada, che subì un notevole rinforzamento, dopo soltanto 1-2 passaggi, arrivando quasi alla virulenza del virus costante del coniglio.

Così noi crediamo con molta probabilità che l'organismo del lupo non possa rinforzare ultoriormente il virus rabbico fisso, più di quanto faccia l'organismo del coniglio; ma anche crediamo che esso virus non possa ulteriormente attenuarsi, dopo che ha acquistato una vera naturalizzazione nel suo organismo, da poterlo fin anco chiamare dopo i predetti passaggi *virus fisso del lupo.*

La forma con cui gli animali sono morti è stata quella di rabbia paralitica, analogamente a quella data dal virus fisso originario.

SERIE OTTAVA.

Comportamento negli animali domestici del virus fisso dopo i successivi passaggi attraverso il lupo.

Dopo quanto si era sperimentato, e analogamente a quanto si era fatto pel virus di strada, interessava conoscere se il virus fisso, che manteneva costante la sua virulenza attraverso i successivi passaggi nel lupo, subisse modificazioni quando si fosse riportato negli animali domestici,presso i quali è ben noto il suo meccanismo e il comportamento.

Si sono scelti i midolli del 1° e del 4° passaggio nel lupo, e si sono fatti esperimenti nei cani, conigli, cavie; l'inoculazione si è sempre fatta per trapanazione.

Inoculazione col virus rabbico del 1° lupo.

(Vedi Serie V — Esper. 1ª).

ANIMALE d'esperimento	GIORNO della inoculazione	GIORNO in cui subentra la paralisi	GIORNO della morte	DURATA dello esperimento
Coniglio	3 giugno	8 giugno	10 giugno	7 giorni
Coniglio	3 »	7 »	10 »	7 »
Coniglio	3 »	7 »	9 »	6 »
Cane	3 »	9 »	12 »	9 »
Cane	4 »	9 »	12 »	8 »
Cane	4 »	9 »	11 »	7 »
Cavia	4 »	9 »	10 »	6 »
Cavia	4 »	9 »	11 »	7 »
Cavia	4 »	8 »	10 »	6 »
Gatto	5 »	10 »	12 »	7 »
Gatto	5 »	11 »	13 »	8 »

Inoculazione col virus rabbico del 4° lupo.

(Vedi Serie VI — Esper. 3ª).

Coniglio	27 giugno	2 luglio	4 luglio	7 giorni
Coniglio	27 »	1 »	3 »	6 »
Cane	27 »	3 »	5 »	8 »
Cane	27 »	2 »	4 »	7 »
Cavia	28 »	2 »	3 »	5 »
Cavia	28 »	3 »	4 »	6 »
Gatto	28 »	3 »	5 »	7 »
Gatto	28 »	4 »	6 »	8 »

La conclusione di questa serie d'esperimenti è abbastanza evidente. Viene dimostrato che il virus fisso, dopo uno o più passaggi attraverso l'organismo del lupo, inoculato al coniglio, mantiene la sua virulenza costante, producendo a questo la morte in 6–7 giorni e comportandosi analogamente al virus fisso naturale originario. Altrettanto può dirsi per la cavia e per il gatto, nei quali animali il periodo d'incubazione e la durata in vita furono anche normali.

Ciò fa confermare ancora più il fatto, che il virus fisso attraverso l'organismo del lupo non subisce ulteriori modificazioni di rinforzamento o di attenuamento, in quanto che inoculato negli animali mantiene la sua virulenza costante primitiva.

Fa eccezione il cane il quale, in seguito alla inoculazione del virus, che ha subito diversi passaggi attraverso l'organismo del lupo, sembra mostrarsi recettivo, perchè ha un periodo d'incubazione e una durata di vita più breve di quelli che ha in seguito alla inoculazione dell'ordinario virus fisso. Altrettanto s'è osservato per i cani, come abbiamo visto, che sono stati inoculati col virus di strada rinforzato attraverso il lupo.

SERIE NONA.

Comportamento del virus rabbico degli animali inoculati con virus fisso di lupo, nei passaggi successivi sugli animali della stessa specie.

Un'ultima ricerca che ci parve interessante di istituire fu quella di vedere se il virus rabbico dei diversi animali domestici, morti per inoculazione di *virus fisso di lupo*, (originariamente virus fisso di coniglio, rimasto invariato attraverso i diversi passaggi nell'organismo del lupo, tanto da potersi permettere, anche per intenderci e per abbreviare, di chiamarlo *virus fisso del lupo*) subisse delle modificazioni passando in altri animali della stessa specie.

Lo scopo della ricerca è quasi analogo a quello della Serie IV, e ad essa ci riferiamo senza qui spendere ulteriori parole.

Ho scelto come virus rabbico da inoculare il midollo preso dagli animali morti per inoculazione di virus fisso dopo 4 passaggi nel lupo. Riporto gli innesti e i passaggi fatti nella seguente tabella:

Virus rabbico di animali dopo il 4° passaggio del virus fisso nel lupo.

(Vedi Serie VI — Esper. 3ª).

Numero dei passaggi	ANIMALE d' esperimento	GIORNO della inoculazione	GIORNO in cui subentrano sintomi di paralisi	GIORNO della morte	DURATA dello esperimento
I	Coniglio	27 giugno	1 luglio	3 luglio	6 giorni
II	Id.	3 luglio	7 »	8 »	5 »
III	Id.	8 »	13 »	15 »	7 »
IV	Id.	15 »	20 »	21 »	6 »
I	Cane	27 giugno	2 »	4 »	7 »
II	Id.	4 luglio	10 »	12 »	8 »
III	Id.	13 »	19 »	21 »	8 »
IV	Id.	22 »	27 »	29 »	7 »
I	Gatto	28 giugno	3 »	5 »	7 »
II	Id.	5 luglio	9 »	11 »	6 »
III	Id.	11 »	17 »	19 »	8 »
IV	Id.	19 »	23 »	24 »	5 »
I	Cavia	28 giugno	2 »	3 »	5 »
II	Id.	3 luglio	8 »	9 »	6 »
III	Id.	9 »	13 »	14 »	5 »
IV	Id.	14 »	18 »	19 »	5 »

I risultati di questa serie di esperienze si possono brevemente compendiare così: che il virus fisso passato per uno o più passaggi attraverso il lupo, quando viene riportato negli animali (conigli, cavie, gatti) per la continuazione normale delle inoculazioni in serie, non perde alcuna delle sue proprietà primitive, poichè si comporta su questi come se la serie non fosse mai stata interrotta per gli eterogenei passaggi, continuando la sua costanza nella virulenza.

Infatti la morte degli animali avviene in 7, 6, 5 giorni a secondo la specie, con 3, 4, 5 giorni d'incubazione e nè più nè meno come il virus fisso a serie non interrotta; ciò che in altri termini vuol dire che il virus fisso di serie passa nel lupo come in un organismo omogeneo, ossia come in un animale avente la stessa proprietà dell'organismo del coniglio, cioè di rinforzare o mantenere costante rispetto alla serie la virulenza del virus rabbico fisso.

Fa eccezione il cane, il quale mantiene nelle inoculazioni in serie quel grado di rinforzamento superiore al virus fisso, che gli proveniva in seguito ai passaggi nel lupo; ciò che del resto abbiamo visto anche avvenire nelle altre serie di esperienze, e ciò che anche Celli e Marino-Zuco hanno visto avvenire per il passaggio del virus fisso da cane a cane.

SERIE DECIMA

Comportamento nel lupo del virus fisso attenuato.

Bisognava infine iniziare delle ricerche, analoghe a quella della Serie quarta, per vedere come si comportasse nel lupo il virus rabbico fisso a sua volta artificialmente attenuato. I risultati si prevedevano analoghi a quelli della Serie IV, predetta, ma tuttavia nulla si poteva stabilire per quanto riguardava la durata della virulenza e il rapporto con gli altri animali. L'inoculazione del virus fu fatta subdurale e fu estesa al lupo, al cane, al coniglio. Per l'attenuazione si prese un pezzetto di midollo di serie, si emulsionò in acqua distillata sterilizzata e si tenne per 60 ore alla temperatura della stufa a 35°.

Esperienza 1ª.

I. Lupo piccolo di 4 mesi piuttosto mansueto.

15 febbraio. Inoculazione.
21 « Comparsa dei primi sintomi.

23 febbraio.	Paralisi.
24 »	Morte.
	Durata in vita dell'animale 9 giorni.

II Cane di media grandezza.

15 febbraio	Inoculazione.
28 »	Comparsa dei primi sintomi.
2 marzo.	Paralisi.
5 »	Morte.
	L'animale visse 18 giorni.

III. Coniglio di media taglia.

15 febbraio.	Inoculazione.
25 »	Comparsa dei primi sintomi.
27 »	Paralisi.
28 »	Morte.
	L'animale visse 13 giorni.

ESPERIENZA 2.ª

I. Lupo piccolo di 4 mesi piuttosto mite

	Viene inoculato col midollo del 1° lupo, cioè di quello morto nella esperienza sopra-riferita.
25 febbraio.	Inoculazione.
2 marzo.	Cambiamento d'umore.
3 »	Paralisi.
5. »	Morte — Durata in vita dell'animale 8 giorni.

II. Cane volpino piccolo.

	Viene inoculato col midollo del primo cane.
5 marzo.	Inoculazione
15 »	Comparsa dei primi sintomi.
17 »	Paralisi.
19 »	Morte.
	L'animale visse 14 giorni.

III. Coniglio di media taglia.

	Viene inoculato col midollo del 1° coniglio.
1 marzo.	Inoculazione.
8 »	Comparsa dei primi sintomi.
10 »	Paralisi.
11 »	Morte.
	L'animale visse 10 giorni.

Come si vede, da questa serie di esperimenti, il virus fisso attenuato artificialmente, si esalta assai rapidamente, e quasi fin dal primo passaggio ripiglia la sua prima virulenza, ciò che nel coniglio non avviene se non dopo parecchi passaggi.

Infatti, nel 1° lupo la durata di vita fu di 9 giorni, nel 2° fu di 8, mentre nel 1° cane fu di 18 e nel 2° fu di 14, come nel 1° coniglio fu di 13 e nel secondo di 10.

Adunque anche pel virus rabbico fisso, artificialmente attenuato, l'organismo del lupo ne esalta assai presto la virulenza.

A questo punto noi chiudiamo la serie delle nostre ricerche, con le quali crediamo di aver colmato in buona parte la lacuna esistente sulla rabbia sperimentale del lupo, e di aver contribuito con esse a chiarire molti punti importanti e prima non ancora definiti, per quanto riguarda la patologia sperimentale della rabbia e le sue pratiche applicazioni.

Ci sia pertanto permesso di riassumere i risultati più salienti, ottenuti nelle diverse serie di esperimenti, rimandando per ulteriori dettagli alle relative osservazioni fatte ai singoli capitoli.

Il virus di strada, passando attraverso il lupo, gli conferisce la rabbia furiosa, con treno fenomenico molto più grave di quello del cane; il periodo d'incubazione è più breve e corrispondentemente la morte sopraggiunge in un tempo più breve (Serie I).

Se però il virus di questo lupo. morto di rabbia furiosa si trasporta per successivi passaggi in altri lupi, allora esso si rinforza sempre più fino ad arrivare dopo 1 o 2 passaggi a una virulenza quasi costante, che è di circa 8 giorni; il periodo d'incubazione è in questo caso di 4-5 giorni e la morte avviene per rabbia paralitica; il rinforzamento adunque è tale da paragonarsi a quello che nel coniglio si ottiene dopo moltissimi passaggi (Serie II).

Se per mezzo di questo virus di strada, così rinforzato attraverso il lupo, si fanno inoculazioni negli animali domestici, questi soccombono

più rapidamente di quando vengono inoculati col virus di strada; e quanto più forte è stato il rinforzamento subìto da questo virus, attraverso i diversi e successivi passaggi nel lupo, tanto più rapida avviene la morte degli animali domestici inoculati; si arriva così a un limite di tempo quasi paragonabile alla durata di vita concessa agli animali dal virus fisso (Serie III).

Il virus di strada rinforzato attraverso il lupo per uno o più passaggi e che concedeva agli animali cui s'inoculava una durata di vita relativamente corta, non si modifica affatto nella sua virulenza, quando per successivi passaggi viene trasportato negli animali della stessa specie; anzi se questa virulenza acquistata dal virus di strada attraverso il lupo non era massima, allora il virus, inoculato negli animali per successivi passaggi, segue la legge naturale del suo ulteriore rinforzo, e ciò bene inteso, quando la specie animale ne sia recettiva (coniglio, cavia, gatto); se il rinforzo subìto nel lupo è massimo, il virus allora si comporta come il virus fisso di coniglio (Serie IV).

Se poi s'inocula nel lupo un virus a virulenza costante, come è il virus fisso del coniglio, si nota che esso gli trasmette la rabbia paralitica con un periodo d'incubazione, analogo a quello dei conigli inoculati col virus fisso; e quindi si deve ammettere che l'organismo del lupo di fronte al virus fisso si comporta favorevolmente come l'organismo del coniglio o più recettivo ancora, se vogliamo giudicarlo dalla grandezza del corpo del lupo di fronte a quella del coniglio (Serie VI).

Se il virus fisso poi si fa passare attraverso una serie di lupi, la virulenza è sempre costante; e non subendo ulteriore rinforzamento, possiamo dire che il virus subisce nell'organismo del lupo una vera naturalizzazione da poterlo chiamare virus fisso di lupo (Serie VII).

Se dopo questi passaggi attraverso il lupo, il virus fisso si trasporta negli animali domestici, presso i quali è ben noto il suo comportamento, allora la morte di essi avviene con lo stesso periodo d'incubazione e durata di vita che col virus fisso naturale; ciò che conferma sempre più il fatto della nessuna modificazione nella virulenza del virus fisso. (Serie VIII).

Se infine il virus fisso, passato attraverso il lupo e inoculato nei diversi animali domestici, da questi si trasporta ad altri della stessa specie per successivi passaggi di serie, allora su essi si comporta con la stessa virulenza primitiva, come se la serie del virus fisso non fosse stata interrotta; passa adunque il virus fisso nell'organismo del lupo come sur un organismo dotato di recettività e di esaltamento (Serie IX).

Se il virus di strada (Serie V) e rispettivamente il virus fisso di

coniglio (Serie X) vengono artificialmente in qualche modo attenuati (in grado tale da dar sempre la morte degli animali con un ritardo più o meno notevole) e poi si fanno passare attraverso l'organismo del lupo, allora bastano 1-2 passaggi, perchè essi virus attenuati ripiglino il loro grado di virulenza primitivo; e ciò nel lupo avviene molto più presto di quanto non avvenga nel coniglio con uguali passaggi.

Questi risultati come conclusione generale ci dimostrano che veramente il virus rabbico trova nel lupo un terreno assai favorevole per l'esaltamento rapido della sua virulenza, anche quando quello sia precedentemente attenuato. La durata d'incubazione è generalmente corta, ed anzi più corta di quella del virus fisso del coniglio, a condizioni uguali di peso dell'animale. Si può così stabilire, e non più per semplice congettura o induzione, che il virus rabbico del lupo ha un'azione veramente energica e una virulenza fortissima che si mantiene costante nella trasmissione del virus ad altri animali.

Ora, per quell'addentellato che tali risultati possono avere nella pratica, torna facile di rispondere alla domanda se e in quanto la morsicatura del lupo sia più dannosa di quella del cane.

Invero, la morsicatura del lupo è in ogni caso molto più dannosa di quella del cane, come la pratica clinica aveva già assodato, e ciò perchè essa realizza alcune condizioni di indubbia gravità, delle quali alcune ben note e che così si possono riassumere; la estensione, vastità, molteplicità e località delle ferite (viso, collo, ecc.) che interessano i diversi strati dei tessuti superficiali e profondi, stando alla struttura dei denti e alla naturale ferocia dell'animale; la inoculazione contemporanea di una rilevante quantità di virus, corrispondente al numero e vastità delle ferite stesse; il riassorbimento rapido del virus, favorito dalla estensione dei tessuti lesi che meglio si prestano a tale scopo; *le proprietà più energiche del virus stesso* che acquista nell'organismo del lupo un esasperamento, un esaltamento massimo della virulenza; la incubazione relativamente corta della malattia, come risultante naturale dei predetti concomitanti fattori.

Da queste condizioni emerge il risultato pratico che la cura profilattica Pasteur, che tanti benefici servigi ha reso all'umanità, preservando dalla rabbia un gran numero di persone, in vista degli insuccessi avuti nei morsicati da lupo, per prevenire sicuramente lo sviluppo della rabbia in questi casi, esige ancora dei perfezionamenti che gli attuali metodi non hanno raggiunto e che devono avere il loro scientifico fondamento nello studio ponderato delle condizioni sopra espresse.

Potendo infatti, come risulta dalle esperienze, possedere il virus

del lupo un'azione analoga o più forte del virus fisso di coniglio, parrebbe teoricamente giustificato, nella cura di questi casi, il criterio della inoculazione accelerata dei midolli fino a quello freschissimo di giornata, ripetendo più volte la serie dei midolli più attivi, prolungando la durata della cura e aumentando la quantità dell'emulsione del virus da inocularsi.

Bisognerebbe quindi fare una cura sopraintensiva, cioè a dire più forte di quella che ordinariamente si pratica col trattamento intensivo per le ferite profonde e gravi della testa, della faccia, ecc., fatte dai cani; senza trascurare d'ingiungere ai morsicati di far causticare profondamente e largamente (con agenti veramente capaci di distruggere il virus rabbico) le ferite subito se è possibile, e in ogni caso, anche quando siano trascorse delle ore o anche qualche giorno; e infine di ingiunger loro di ricorrere immediatamente alla cura nei più vicini Istituti antirabbici [1].

Come appendice alle precedenti esperienze sulla rabbia del lupo, mi sia permesso ricordare brevemente tre recenti pregiatissimi lavori che hanno una certa attinenza con le mie ricerche.

Il primo lavoro è quello già accennato di Celli e Marino-Zuco (39), sulla trasmissione del virus rabbico da cane a cane.

Da alcune ricerche dei prelodati autori si rileva che il virus fisso attraverso il cane non si attenua come farebbe il virus di strada; anzi, a giudicare dai giorni sempre più pochi del periodo d'incubazione, cui gli animali successivamente trapanati soggiacciono, si potrebbe dire che in essi cani la rabbia paralitica è progressivamente più intensa.

Ora, la stessa analogia di risultati abbiamo noi potuto riscontrare nei successivi passaggi attraverso i cani (e anche attraverso altri animali) con virus sia di strada che fisso, che era passato precedentemente una più volte attraverso l'organismo del lupo. Ciò vale sempre più a confermare i punti di contatto che la virulenza del virus fisso del coniglio ha con quella del virus naturalizzato nel lupo.

Il secondo è quello di De Blasi e Russo-Travali (40) sulla rabbia sperimentale del gatto. E qui mi affretto di metter subito in rilievo l'analogia di alcuni miei risultati, con quelli ottenuti dai predetti autori nelle loro ricerche su quell'animale.

Ed invero, come si rileva dalle loro esperienze, e come io stesso potei con qualche esperimento confermare, pare che il gatto si comporti di fronte al virus rabbico, come il lupo.

---

[1] Mi occuperò in altra pubblicazione di discutere ed estendere i miei criteri per la cura dei morsicati da lupo.

Ed infatti lupo e gatto sono un terreno più favorevole del coniglio per l'esaltamento della virulenza del virus rabbico; nell'uno e nell'altro il periodo d'incubazione è sempre corto, e in entrambi gli animali i virus attenuati ripigliano rapidamente la loro virulenza, acquistando quasi subito un periodo fisso d'incubazione, che si può paragonare a quello del virus fisso di coniglio o a un virus anche più forte di questo, se si tien conto della grandezza degli animali.

Il terzo lavoro è quello di Calabrese (41) che riguarda la dimostrazione sperimentale dell' esistenza in natura del virus rabbico rinforzato, già stata anche prima rilevata da Bordoni-Uffreduzzi (42) in un esperimento di laboratorio e condivisa più tardi da Celli e Marino-Zuco per altri esperimenti. Calabrese emise l'ipotesi che tale virus rinforzato possa esistere in natura per via del lupo, il cui virus rabbico avrebbe un'attività speciale. Questa ipotesi, dopo le mie ricerche ha un valore reale, poichè diventa la spiegazione più plausibile dell'esistenza in natura di questo virus rinforzato. Infatti il lupo, che va tanto soggetto all'infezione rabbica, che può assumere forma epidemica duratura e gravissima per anni ed anni come abbiamo già detto, esaltando enormemente la virulenza del virus rabbico, può trasmettere questo così esasperato, in diversi modi e per diverse vie, che a noi spesso sfuggono, e diffonderlo ad altri animali, i quali a loro volta possono ripetere, mantenendo o modificando, l'impronta del grado di virulenza del virus rabbico del lupo, loro primitivamente trasmesso. Ed è su questa ipotesi generale che Celli e Marino-Zuco ammettono che anche la varietà della forma clinica, possa essere in rapporto colla diversa provenienza del virus e colla relativa modificazione che esso virus ha già potuto subire passando da uno a un altro animale.

Ed ora chiudendo, mi auguro che queste ricerche sulla rabbia del lupo, che tante apprensioni, tante cure, tante noie, tanto tempo, tante spese mi hanno costato, non servano solo ad illuminare i punti oscuri che si avevano su alcune questioni di patologia, di clinica e d'igiene, ma possano eziandio contribuire a portare qualche piccola luce anche a quel perfezionamento desiderato che la profilassi deve tuttora conseguire, come risorsa pratica dell'umanità e come suggello della bontà definitiva del metodo di cura Pasteur.

BIBLIOGRAFIA

1. Bauhin — Memorabilis historia luporum — Epizoozia di rabbia nei lupi a Montbeliard 1590. — *Dechambre* Diction. Encycl. T. IV. Serie 2ª.
2. Arloing — Les virus — Paris 1891.
3. Galtier — Traité des maladies contagieuses — Asselin et Houzeau — Paris 1892.
4. Bouley et Brouardel — Art. Rage — *Dechambre* loc. cit.
5. Roger — Trattato di medicina di Charcot, Bouchard et Brissaud — Trad. ital. diretta da B. Silva — Torino.
6 Zagari — Trattato italiano di medicina — Cantani e Maragliano — Vallardi — Milano.
7. Bollinger — Ziemssen — Trattato di Pat. e Terapia — Vol. Zoonosi.
8. Pasteur — Per questa ed altre citazioni, vedi la collezione degli *Annales de l' Institut Pasteur* 1887-1893.
9. Petermann — Lettre de M. Pasteur sur la rage — *Annales de l'Institut Pasteur* — 1887 Paris.
10. Parschensky — cit. dal Pasteur — loc. cit.
11. Wyssokowitsch — *Annales de l' Institut Pasteur* 1889.
12. Pasteur — Lettre de M. Pasteur a M. Duclaux — *Annales de l'Institut Pasteur* 1888, n. 3.
13. Leblanc — De la Rage — *Acad. de Médecine* 17 nov. 8 dec. 1885.
14. Dujardin-Beaumetz — Rapport sur les cas de rage qui se son declarè pendant les annèes 1881-83 dans le departement de la Seine — *Rev. d'hyg.* VI. 1884. — Des résultats obtenus par la pratique des inoculations antirabiques etc. *Boullet. de l' Acad. de Med.* 1888.
15. Faber — cit. da J. Arnould — Nouveaux élements d'hygiene — Paris 1889.
16. De Giaxa — Manuale d'Igiene — Vallardi — Milano 1889.
17. Galtier — op. cit.
18. Mathieu — riportato dal Galtier — op. cit.
19. Chuchu — riportato dal Galtier op. cit.
20. Pasteur — Méthode pour prevenir la rage après morsure — *Acad. de Med.* 27 oct. 1885. — riportato dal Galtier — op. cit.
21. Parschensky — riportato dal Pasteur — Lettre sur la rage — *Ann. de l' Inst. Pasteur* 1887.
22. Hoin — Journal de Medicine T. XV, 1853.
23. Arloing — op. cit.
24. Galtier — op. cit.
25. Mathieu et Chuchu — riport. dal Galtier — op. cit.
26. Gamaleya — Sur les prétendues statistiques de la rage — *Ann. de l' Instit. Pasteur.* 1787.
27. Petermann — loc. cit.

28. Gamaleya — Etude sur la rage paralytique chez l'homme — *Ann. de l'Institut Pasteur* 1888.
29. Rioche — riport. da Gamaleya — lav. cit.
30. Pasteur — riportato dal Galtier — op. cit.
31. Suzor — Exposé pratique du traitement de la rage par la méthode Pasteur — Paris 1888.
32. Vulpian — Statistique générale des personnes qui ont été traitée a l'Institut Pasteur — *Acad. des Sciences* T. CIV. Seance 24 Ianv. 1887.
33. Mathieu — citato dal Galtier — op. cit
34. Gamaleya — lav. sopracit.
35. Zagari — op. cit.
36. Poppi — Bollettino delle Scienze Mediche 1890 — Bologna.
37. Pasteur — Lettre a M. Duclaux sur la rage — lav. sopracit.
38. Galtier — op. cit.
39. Celli e Marino-Zuco — Sulla trasmissione del virus rabbico da cane a cane — Questi *Annali*, vol. II. 1892.
40. De Blasi e Russo Travali — La Rage experimentale chez le chat — *Ann. de l'Inst. Pasteur* 1894, e Rivista d'Igiene — Roma.
41. Calabrese — Sur l'esistence dans la Nature d'un virus rabique renforcè — *Ann. de l'Institut Pasteur* 1896.
42. Bordoni-Uffreduzzi — La Rabbia canina e la cura Pasteur — Torino 1889.

Laboratorio Micrografico Municipale di Messina

SULLA TRASMISSIONE DELLA PESTE BUBBONICA

PER LE VIE DIGERENTI

PER I DOTTORI

IVO BANDI e FRANCESCO STAGNITTA BALISTRERI

Le attuali conoscenze sopra il grado di resistenza del b. della peste agli agenti naturali, i dati epidemiologici, e le esperienze di laboratorio, non hanno ancora messo in perfetta luce, se la penetrazione di questo germe nell'organismo avvenga per le vie respiratorie, per lesioni cutanee, o per l'apparato digerente. La diffusione del germe pestifero per l'aria, infirmata dalle esperienze di Kitasato, Wilm [1], Tholozan, Germano [2], i quali negano la resistenza del germe all' essiccamento completo, quale è necessario perchè esso venga trasportato col pulviscolo atmosferico, viene posta di nuovo in evidenza, da una osservazione di De Giaxa e Gosio [3], i quali ammettono per il germe della peste una resistenza abbastanza accentuata all' essiccamento, e concludono quindi che fra le vie d'infezione naturale, quella respiratoria, sarebbe la più grave.

L'Abel [4] pur ammettendo che il b. della peste in date condizioni mostra una resistenza relativamente piccola all'essiccamento, conviene che non bisogna attribuire a questo mezzo di sterilizzazione naturale. un valore troppo assoluto, specialmente nei nostri climi.

Wyssokowitz e Zabalotny [5] avrebbero riscontrato 6 volte, su 24 osservazioni, la polmonite primitiva da b. pestogene. Questi autori, in

---

[1] *Ueber die Pestepidemie in Hong-Kong.* 1896. *Hygienische Rundschau*, n. 5-6, 1897.

[2] *Die Uebertragung von Infections krankheiten durch die Luft.* Zeitschrift. f. Hyg-1897.

[3] Questi Annali, Vol VII, nuova serie. Fascicolo II, 1897. *Ricerche sul b. della peste in rapporto alla profilassi.*

[4] *Zur Kenntniss des Pestbacillus. Centralbl. für Bakt.*, etc. 1897.

[5] *Recherches sur la peste bubonique. Ann. de l'Inst. Pasteur*, Août, 1897.

base alle loro osservazioni, distinguono due differenti quadri clinici di peste:

1. Peste con buboni.

2. Peste senza buboni esterni, sotto forma di polmonite specifica primaria. Alcuni rari casi di affezione primitiva del polmone, vengono pure segnalati nella relazione della Commissione tedesca, composta dei professori Gaffky, Pfeiffer, Dieudonné e Sticker [1], recatasi a Bombay nel marzo del 1897, per seguirvi da vicino il corso della epidemia di peste.

Il Wilm [2] che studiò l'epidemia di peste di Hong Kong nel 1896, dice di non avere mai riscontrato nell'aria il b. della peste nei numerosi esami da lui eseguiti, e che il quadro clinico di questa malattia e le lesioni patologiche, non depongono in favore della infezione per le vie respiratorie. Tuttavia ci troviamo dinanzi ad un fatto che potrebbe in determinate condizioni verificarsi, e conviene osservare, che anche non volendo ammettere che le vie respiratorie rappresentino il mezzo più comune di trasmissione del germe della peste, le esperienze di De Giaxa e Gosio non perdono perciò del loro valore, in rapporto alla profilassi di questa malattia poichè, come venne recentemente dimostrato dal Flügge [3] non devesi ritenere che un germe anche poco resistente all'essiccamento, non sia diffusibile per l'aria, data la estrema frazionabilità delle particelle di liquidi che possono contenere germi patogeni, e quindi il possibile trasporto di essi per le correnti atmosferiche, anche impercettibili.

Quanto alla infezione per la via della cute, viene ammessa dalla maggior parte degli sperimentatori (Kitasato, Jersin [4], Aoyama) [5]. Questi anzi da vari fatti, e specialmente dall'osservare che comunemente notasi l'insorgere del caratteristico bubone in corrispondenza di lesioni cutanee, giudica essere questa la più comune via d'infezione. Lo stesso parere, trovasi espresso nella relazione della Commissione tedesca, di cui già abbiamo fatto parola. A conclusioni differenti viene il Wilm [6], il quale in base ad accurate e ripetute osservazioni cliniche, ammette

[1] *Mitteilungen der Deutschen Pestkommission aus Bombay.* (*Dtsche med. Wochensch.* 1897, n. 17, 19, 31. n. 32. *Centralblatt. für Bakt.* Bd. XXII, n. 16, 17, 1897.

[2] Loco citato.

[3] *Zeitschr. f. Hyg.* Bd. XXV, 1897. *Ueber Luftinfection.*

[4] *Sur la peste bubonique. Ann. de l'Inst. Pasteur.* 1897.

[5] *Mitteilungen über die Pestepidemie im Iahre* 1894 in Hong Kong. *Centralblatt. f. Bakt.* Bd. XIX, n. 12-13.

[6] Loco citato.

l'infezione per la cute come una eccezione, mentre la via per la quale più comunemente avviene l'infezione sarebbe, per esso, il tubo digerente. Oltre ai fatti clinici e anatomo patologici, quali il non avere trovato che in soli due casi lesioni cutanee in corrispondenza del caratteristico bubbone [1], la presenza dei germi specifici nelle feci dei malati, le lesioni accentuate al massimo grado negli intestini, nei gangli meseraici e nello stomaco, il Wilm porta in appoggio della sua opinione, l'aver isolato il germe specifico in un pozzo mal costruito, in una località ove infieriva la peste; osservazione che aumenta di valore, per il fatto che tra gli Europei, che servivansi di acqua di conduttura non inquinata, si ebbero pochissimi casi di peste. Pur non volendo escludere la possibilità d' infezione per altre vie, ove si consideri, che il germe della peste può vivere diversi giorni nelle acque dolci o salate e nelle derrate alimentari di vario genere, se ne può dedurre che un grandissimo contingente di infezione, possa aver luogo per mezzo delle acque e degli alimenti inquinati.

In seguito a tali considerazioni, abbiamo creduto utile istituire alcune esperienze di prova sulla infezione di peste per le vie digerenti, essendo la questione tutt'altro che definita, poichè mentre alcuni, e tra questi Jersin [2], Lustig e Galeotti [3], ne hanno dimostrata la riproduzione sperimentale, altri, tra i quali Gaffky, Pfeiffer, ecc. [4] De Giasca e Gosio [5], Lowson [6], Wyssokowitz e Zabolotny [7], negano, basandosi su dati clinici, e su prove sperimentali, non sempre dimostrative, che l'apparato digerente possa rappresentare una delle vie d' ingresso del germe pestogene nell'organismo.

Il bacillo usato nei nostri esperimenti, proviene da Bombay. I suoi caratteri culturali corrispondono a quelli descritti fin' ora dai vari sperimen-

[1] Wyssokowitz e Zabolotny, spiegano questo fatto, con la costante mancanza di reazione locale, in conseguenza della introduzione del germe pestogene nel tessuto sottocutaneo, come essi avrebbero osservato sperimentalmente nelle scimmie. Appare strano, che gli stessi autori, ammettendo l'invasione del sistema linfatico da parte del b. della peste, senza che rimanga traccia visibile della via d'entrata, vengano poi a negare la possibilità della infezione per le vie digerenti, per il fatto che essi non hanno mai riscontrati casi di peste, con disturbi gastroenterici primari.

[2] Loco citato.

[3] *Versuche mit Pestschutzimpfungen bei Tieren Dtsche med. Wochenschr.* 1897, n. 15. Centr. f. Bakt. Bd. XXII, n. 2, 3, 1897.

[4] Loco citato.

[5] Loco citato.

[6] *Notes on the plague in China. The Lancet.* 1895 July 27.

[7] Loco citato.

tatori. Circa i caratteri morfologici, noi abbiamo notato con una certa costanza, specialmente dopo ripetuti passaggi del germe per il corpo di animali da esperimento, la presenza nelle culture di forme allungate. proteiformi, isolate, o poste al termine di catene di bacilli. Queste forme che danno l'idea di vari elementi fusi insieme, dimostrano un polimorfismo abbastanza accentuato del bacillo della peste, e non hanno niente di comune colle forme involutive ovoidali e circolari, descritte da alcuni, specialmente da Hankin e Leumann [1] come caratteristiche del b. della peste, perchè noi le abbiamo riscontrate nelle giovani culture, e sono perfettamente colorabili

Gli animali da noi scelti per esperimento furono le cavie, che hanno per la peste una recettività quasi uguale a quella dei ratti e dei topi, ritenuti da Jersin quali iniziatori e principali propagatori delle epidemie di peste.

Gli animali posti ad esperimento furono quarantasette, divisi in serie separate. Nessun artifizio fu da noi usato per preparere gli animali alla infezione, allo scopo che le esperienze si svolgessero nella maniera più naturale possibile.

Trentanove cavie sono state nutrite con culture in brodo di 24 ore. mescolate al cibo in quantità di 5 a 2 cmc. di cultura ogni giorno per ciascuna. Le altre otto sono state nutrite con pane inzuppato nel sangue e nei visceri di altre cavie morte di peste. (V. Esperienze in appendice).

Il materiale infetto, ingerito dagli animali, si riduceva, naturalmente, ad una quantità molto esigua, poichè gran parte di esso veniva disperso.

Possiamo fin da ora dire, che i nostri esperimenti hanno avuto esito completamente positivo, giacchè tutti gli animali sottoposti al trattamento suesposto, sono morti indistintamente, e la differenza è solo stata nella durata e nella modalità dell'infezione, fatti aggiudicabili in parte al numero dei germi ingeriti, in parte a cause che sfuggono alla nostra osservazione.

Una delle cavie, che mangiavano pane intriso di visceri appestati, e tre di quelle che mangiavano le culture, sono state colpite da paralisi completa del treno posteriore, con forte dispnea, e sono morte dopo dopo due-tre giorni dalla ingestione del materiale infetto. All'autopsia non abbiamo potuto riscontrare nessuna alterazione per spiegare il fenomeno, tranne una leggiera iperemia intestinale. Le culture fatte dal sangue e dagli organi, riuscirono sterili. Il fatto appare anche più strano, non potentosi invocare per spiegarlo l'azione tossica dei materiali ingeriti, giacchè in alcune prove all'uopo iniziate, abbiamo visto resistere le cavie ad iniezioni sottocutanee e endoperitoneali di quantità grandi

[1] *A Method of Rapidly Identifying the Microbe of Bubonic Plague. Centralblatt. f.* Bakter. 1897, Bd. 22.

(fino a 12 cm^3), di culture di un mese sterilizzate a 58° per un'ora o filtrate per candela di Chamberland, senza presentare disturbi apprezzabili, come risulta dalle seguenti esperienze:

Da un pallone di cultura di 48 ore in brodo glicerinato al 2 °/₀ di b. della peste, esposto per un'ora in un bagno-maria alla temperatura di 58° C., togliamo il materiale per l'esperimento che segue:

	Peso	Quantità di materiale inoculato	Luogo d' innesto	Esito
Cavia A . .	gr. 500	$cm.^3$ 2	Sotto cute.	Sopravvive senza presentare alcun segno di malessere.
» B . .	gr. 400	cm^3 5	Id	Id.
» C . .	gr. 480	cm^3 5	Nel peritoneo.	Id.
» D . .	gr. 520	$cm.^3$ 12	Id	Lievi sintomi di malessere generale, che scompaiono dopo poche ore.

Da un pallone di cultura di 15 giorni in brodo glicerinato al 2 °/₀ di b. della peste, filtrata per candela di Chamberland, preleviamo una certa quantità, che viene usufruita come appresso:

	Peso	Quantità di materiale inoculato	Luogo d' innesto	Esito
Cavia E . .	gr. 300	cm^3 3	Sotto cute.	Sopravvive, senza presentare segni di malessere
» F . .	gr. 400	$cm.^3$ 7	Id.	Id.
» G . .	gr. 500	$cm.^3$ 10	Nel peritoneo.	Leggieri sintomi di malessere che presto scompaiono.
» H . .	gr. 450	$cm.^3$ 12	Id.	Id.

Per la esperienza seguente ci serviamo di cultura in brodo glicerinato al 2 °/₀ di un mese, ricchissima di corpi bacterici, esposta per un'ora alla temperatura di 58° C.

	Peso	Quantità di materiale inoculato	Luogo d' innesto	Esito
Cavia I. . .	gr. 370	cm.³ 10	Nel peritoneo.	Presenta leggieri sintomi di malessere generale, che scompaiono dopo poche ore
» Y . .	gr. 500	cm.³ 12	Id.	Id.
» L . .	gr. 530	cm.³ 12	Id.	Id.

Il risultato di queste nostre esperienze è in piena contradizione con quello ottenuto da Jersin, Calmette e Borrel (*La peste bubonique*. Deuxième note. Ann. de l'Institut Pasteur, juil 1895), i quali dicono di aver ucciso costantemente le cavie e i conigli, con inoculazioni endovenose ed endoperitoneali, di culture di b. pestogene, riscaldate a 58° per un'ora. Un altro fatto importante, messo in evidenza nei nostri esperimenti, è che coll'aumento della virulenza del germe, passató con inoculazioni consecutive, per il corpo degli animali, aumenta il potere patogene di esso per le vie digerenti. Tanto che mentre le prime cavie, da noi sottoposte a trattamento, morirono in 10-12 giorni, siamo giunti a fare ammalare e morire altre cavie dopo 48-72 ore, tempo sempre necessario a produrre esito letale, usando anche culture virulentissime per iniezione.

I segni patognomonici della infezione di peste per le vie digerenti. non differiscono in generale da quanto osserviamo nella infezione sperimentale per iniezione. Notansi i soliti sintomi di una infezione grave, esplicantisi con una estrema prostrazione dell'animale, talvolta paralisi del treno posteriore, dolorabilità del ventre al tatto, e non costantemente, diarrea sanguinolenta.

Questi due ultimi fenomeni riscontransi anche nella infezione per inoculazione a un di presso con la stessa frequenza. Il fatto cha costantemente manca, e che noi abbiamo notato solo in altuni casi di infezione per via gastrica a decorso cronico, di cui terremo in seguito parola, è la presenza dei caratteristici bubboni inguinali o ascellari, che notansi costantemente nella infezione per via sottocutanea.

Il reperto anatomo-patologico nella peste sperimentale, ottenuta sia per inoculazione, sia per ingestione di materiale infetto, offre delle varianti assai accentuate non solo nelle generalità, ma riguardo ai vari organi. Infatti, in ambedue i generi d'infezione, non sempre raggiungono la stessa intensità i fenomeni di reazione generale, quali gli essudati siero-fibrinosi ed emorragici delle cavità pleurica e peritoneale, e le iperemie degli organi toracici e addominali. D'altra parte, anche nei casi in cui l'infezione decorre colla stessa durata, notansi differenze notevoli nel grado d'invasione dei vari organi da parte dei germi. Così nella infezione per inoculazione sottocute, varia il grado di ipertrofia delle glandole linfatiche limitrofe al luogo d'innesto, e d'infiltrazione del connettivo periglandolare. Nella infezione per via gastrica, tale fenomeno riscontrasi per i gangli meseraici. Conviene qui notare che in ambedue i metodi d'infezione, tranne alcuni casi nei quali si ottiene la morte degli animali d'esperimento per una rapida setticemia, la propagazione del germe si effettua evidentemente per le vie linfatiche. Al caratteristico bubbone del cavo inguinale o ascellare che segue alla infezione per via cutanea in vicinanza del luogo d'innesto, fa riscontro nell'infezione per via gastrica una ipertrofia accentuata delle ghiandole meseraiche, e il più delle volte, un vero bubbone di una di tali ghiandole. I fenomeni intestinali non sono sempre costantemente più accentuati nella infezione per via gastrica in confronto con quella per inoculazione, e perciò conviene pensare che la enterite emorragica non sempre rappresenti l'inizio della infezione, e che il germe non attecchisca sulla mucosa intestinale, in seguito a lesioni anatomiche di essa. Le nostre osservazioni sono, a questo proposito, in pieno accordo con quelle di Wyssokowitz e Zabolotny [1], e noi pure consideriamo i disturbi intestinali come l'espressione locale della intossicazione generale, o della setticemia, sempre secondaria. Ma il riscontrare costantemente nella infezione per via gastrica una maggiore ipertrofia delle placche del Payer e dei follicoli linfatici, specialmente in vicinanza del bubbone addominale, fa supporre che in questi casi, la via d'ingresso del germe sia appunto rappresentata dal sistema linfatico intestinale.

A convalidare questra nostra opinione sta il fatto che nelle cavie uccise durante l'infezione, mai abbiamo riscontrato i germi della peste nel sangue circolante, mentre ne erano infarcite le ghiandole linfatiche. e li abbiamo trovati quasi sempre localizzati nei vari organi, specialmente nella milza e nel fegato.

---

1 Loco citato.

Il b. della peste, deve quindi considerarsi come parassita del sistema linfatico, e nei casi in cui lo riscontriamo nel sangue, ci troviamo dinanzi ad un fatto avvenuto *post mortem*, o negli ultimi momenti di vita, quando l'organismo offre il minimo di resistenza all'infezione.

Sopra un altro fenomeno abbiamo posta l'attenzione nelle nostre esperienze, sul ripetersi cioè delle forme nodulari diffuse nella milza e nel fegato, descritte da Jersin [1] e da Houl [2], il quale definisce questa forma di infezione come una *experimentelle Pestgranulie.*

Dalle nostre osservazioni risulta che tali forme, che danno l'idea di vere granulazioni tubercolari, si riscontrano in ordine di frequenza nella milza, quindi nel fegato. Rarissime volte le abbiamo riscontrate nel polmone, nella infezione per inoculazione sottocutanea, mai negli altri organi. Un bell'esempio caratteristico di forme nodulari del polmone lo abbiamo riscontrata in quattro cavie mantenute per alcuni giorni con cibi infetti, senza che apparentemente mostrassero disturbi apprezzabili, le quali ammalarono in seguito di forma cronica, con grossi ingorghi delle ghiandole linfatiche degli inguini delle ascelle e della nuca. In questi soggetti notavasi una difficoltà grande nella respirazione, e abbondante scolo nasale e congiuntivite purulenta [3].

La durata di tali forme a decorso cronico fu da un mese a 45 giorni. All'autopsia notammo degenerazione caseosa delle ghiandole linfatiche in genere; bubbone mesenterico della grossezza in media di una nocciuola fino ad un uovo di pollo; infiltramento emorragico dell'intestino; ipertrofia delle placche del Peyer, specie in vicinanza del caratteristico bubbone; disseminazione miliare di noduli grigiastri nella milza, ipertrofica e emorragica, nel fegato e nei polmoni, che presentavano i segni di una vera pleuropolmonite, con abbondante essudato pleurico purulento e vaste adesioni pleuro-diaframmatiche. In uno dei casi su accennati, quello che ha avuto decorso più cronico, l'apice di uno dei polmoni era trasformato in una vera massa caseosa costituita da accumuli di noduli.

[1] Loco citato.

[2] *Centralb f Bakt.* Bd. XXII, n. 4, 1897.

[3] In un caso, abbiamo riscontrata un'infiammazione parenchimatosa della cornea, con irido ciclite consecutiva. Nello scolo congiuntivale purulento, notavansi numerosi b. della peste. In altri casi di infezione per via sottocutanea, nei quali si è notata panoftalmia purulenta, talvolta bilaterale, abbiamo isolato dal pus lo stafilococco aureo in cultura pura. Nel caso da noi osservato, l'infezione dell'occhio era senza dubbio avvenuta per innesto diretto di b della peste sulla congiuntiva, mentre le affezioni oculari, che spesso sopravvengono, sia nei casi clinici di peste, sia nella riproduzione sperimentale, sono dovute ad infezioni secondarie sostenute da altri germi (piogeni).

Niente altro di notevole del resto, fuorchè emorragie a chiazze dei reni e delle capsule surrenali, e in due casi, degenerazione grassa di porzioni del fegato, messa in evidenza nelle sezioni dei pezzi, fissati nel liquido osmio cromo acetico di Flemming. I noduli caratteristici in queste forme croniche, si presentano per lo più rotondi, a margini netti, a differenza di quanto osservasi nei casi di infezioni acute di peste terminate con gravi setticemie, nelle quali talvolta riscontrasi disseminazione di piccoli noduli a margini irregolari, tendenti a confluire, nella milza, nel fegato e più raramente nel polmone. Tali noduli compressi fra due vetrini e colorati con violetto di genziana o bleu di metilene, appariscono costituiti di sostanza caseosa, nella quale si notano numerosi leucociti disfatti e un gran numero di bacilli. Alla osservazione microscopica delle sezioni degli organi affetti da dette forme nodulari, apparisce chiaramente una marcata differenza nei costituenti istologici, tra le forme di noduli suddescritti. Le forme miliari acute, a margini irregolari spesso confluenti tra loro, costituite da tessuto caseificato, infarcite di bacilli, circondate da forte infiltrazione parvicellulare, sono da considerarsi come giovani focolai bacterici, mentre nelle forme nodulari croniche, ricche di leucociti disfatti, scarseggia la reazione infiammatoria, i bacilli sono più rari; i contorni netti di tali noduli, sono delimitati da una densa capsula fibrosa, talchè nel complesso essi hanno l'aspetto di focolai necrobiotici incistati. Tali forme, devono senza dubbio ritenersi come fasi ulteriori a cui vanno incontro i noduli su descritti, e la capsula fibrosa che le circoscrive, è dovuta alla attività riparatrice del tessuto circostante.

Tali forme croniche, che riscontransi specialmente nelle infezioni per le vie digerenti, sono dovute forse in parte ad una attenuazione che il virus subisce nel canale alimentare, e in parte anche al fatto che pochi germi giungono a penetrare nell'organismo, il quale resiste a lungo alla ulteriore penetrazione del germe, che si compie lentamente, a meno che non sopraggiunga una invasione da parte di nuovi germi virulenti, come noi abbiamo osservato continuando a nutrire le cavie già malate, con materiali infetti; nel qual caso si determina rapidamente l'esito letale.

Come già abbiamo accennato, la sede comune delle forme nodulari è rappresentata dalla milza, dal fegato, e nei casi a lungo decorso, dal polmone. A tal proposito è degno di nota che, inoculando il materiale tolto da un nodulo di una cavia morta di forma cronica, nel sottocutaneo di un'altra cavia, abbiamo riprodotta una infezione a lento decorso, con localizzazione di noduli alla milza, al fegato e specialmente al polmone. Questo materiale così attenuato, inoculato ad altre cavie,

riproduce costantemente tale forma ancora dopo sei passaggi. Nel rene. come negli altri organi mai in nessuna forma, anche nelle più croniche. si è riscontrata la presenza di noduli, e le imponenti emorragie che in questi organi si riscontrano, sono dovute certamente a uno spiccato potere emorragiparo delle tossine elaborate e messe in circolo piuttosto che alla presenza del b. stesso nei vasi, giacchè si riscontrano, e in grado non inferiore, anche nei casi in cui non si tratta di una vera setticemia.

È notevole il fatto che mai, anche nei casi cronici, abbiamo notato il passaggio in circolo di alcuni dei germi della flora intestinale, quantunque in vari casi si avesse una gastro-enterite emorragica imponente. La mucosa gastro-enterica, costituisce dunque realmente una formidabile barriera alla invasione di molti germi, e il suo potere difensivo non viene a mancare anche quando i suoi poteri fisiologici sono notevolmente deteriorati. Questa osservazione convalida l'idea che le affezioni secondarie che notansi spesso sopraggiungere nel corso di varie malattie infettive, difficilmente hanno come via d'ingresso l'apparato digerente.

CONCLUSIONI.

Dall'esame dei fatti suesposti, possiamo concludere che il germe della peste bubbonica deve considerarsi come un germe eminentemente infettante anche per le vie gastro-intestinali, mentre il valore tossico delle sue proteine e dei prodotti del suo ricambio, fuori dell'organismo, è quasi nullo. Col b. della peste si possono riprodurre, negli animali recettivi, tutte le forme cliniche, che riscontransi nell'uomo.

Non resta provato che il germe pestogene penetrato nell'apparato digerente vi apporti disturbi tali, nei suoi poteri fisiologici, che ne facilitino l'attecchimento. È razionale invece il supporre che l'invasione dell'organismo da parte del germe, avvenga per i linfatici dell'intestino.

Le forme d'infezione per la via gastrica, hanno di frequenza decorso più cronico delle infezioni che si effettuano per le altre vie. È prevalentemente in questo genere d'infezioni, che si ha la produzione di forme nodulari diffuse a vari organi, che danno l'idea di forme tubercolari croniche. Le forme a localizzazione polmonare, non indicano di necessità che l'infezione sia avvenuta per le vie respiratorie, ripro-

ducendosi esse costantemente e a preferenza nelle forme croniche di infezione per via gastrica.

Data ora la facilità dell'infezione per le vie digerenti, sostenuta con validi argomenti specialmente dal Wilm, e confermata dalle nostre esperienze, ove si considerino i caratteri di resistenza del germe pestogene nell'ambiente esterno, appare chiaramente, come in caso di epidemie di peste, debbasi dare una importanza maggiore che per il passato alle acque adibite agli usi comuni, e alle derrate alimentari, quali eventuali mezzi di trasmissione della peste.

ESPERIENZE.

Animale da esperimento	Peso	Materiale ingesto	Dose giornaliera	Giorno della morte	Reperto anatomico-patologico
	gr.				
Cavia N. 1	400	Cultura in brodo di 24 ore (*a*) mescolata a crusca e scarola.	cm³ 5	10°	Essudato emorraggico nel peritoneo. Enterite emorraggica, ipertrofia delle placche del Peyer. Ingorghi dei gangli meseraici. Milza tre volte più grossa del normale, nera. Essudato pleurico emorraggico. Numerosi bacilli nel sangue e in tutti gli organi.
» 2	450	»	» 5	10°	
» 3	500	»	» 2	5°	
» 4	300	»	» 2	5°	
» 5	350	»	» 2	5°	
» 6	400	»	» 2	5°	
» 7	300	»	» 2	12°	Mancano i caratteri dell'enterite emorraggica.
» 8	350	»	» 2	3°	Nessun fatto speciale. Le culture fatte dal sangue e dagli organi interni rimangono sterili.
» 9	400	»	» 2	3°	
» 10	450	»	» 2	6°	Numerosi noduli miliari piccolissimi e confluenti nella milza.
» 11	300	Cultura in agar di 24 ore stemperata in acqua e mescolata a crusca e pane.	Materiale raschiato da cultura in agar obbliquo	5°	I soliti fatti notati per le prime sei cavie in vario grado. In tutte e tre numerosi bacilli negli organi e nel sangue.
» 12	350			5°	
» 13	400			6°	
» 14	450			7°	Numerosi noduli miliari confluenti nella milza.
» 15	300	Per 15 giorni culture di un mese in brodo glicerinato al 20 °/o sterilizzate a 58° per un'ora e mescolate al cibo (*b*). Poi cultura in agar di 24 ore stemperata in acqua e mescolata al cibo.	cm³ 10 Materiale raschiato da cultura in agar obbliquo	4°	I soliti fatti con leggiere variazioni di grado specialmente nella reazione intestinale.
» 16	300			4°	
» 17	350			5°	
» 18	400			5°	

(*a*) La cultura adoperata nei nostri esperimenti uccideva in 3-4 giorni le cavie di 400-500 gr. inoculate sotto cute con 1 cm³ di coltura in brodo di 24 ore.

(*b*) Dal risultato di questa esperienza e di quella che segue possiamo dedurre che le sostanze vaccinanti contenute nelle culture del bacillo pestogene, le quali secondo Iersin, Calmette, Borrel (v. lavoro citato) sarebbero attivissime per inoculazione endovenosa, endoperitoneale e sottocutanea, si mostrano del tutto inattive, somministrate per la via gastrica.

Animale da esperimento	Peso	Materiale ingesto	Dose giornaliera	Giorno della morte	Reperto anatomico-patologico
	gr.				
Cavia N. 19	420			6°	
» 20	500			6°	
» 21	450			7°	
» 22	450			7°	
» 23	450			7°	Noduli miliari diffusi nella milza e nel fegato e qualche nodulo isolato nel polmone.
» 24	500			7°	
» 25	400	Per un mese cultura di un mese in brodo glicerinato 2 % sterilizzata a 58° per un'ora. Poi cultura in brodo di 24 ore.	cm³ 10 cm³ 2	20°	Niente di notevole tranne una leggiera iperemia intestinale. Culture fatte dagli organi e dal sangue restano sterili.
» 26	350			3°	
» 27	350			3°	
» 28	450			4°	
» 29	400			3°	
» 30	400			3°	Le solite alterazioni notate per le prime 6 cavie in vario grado.
» 31	350			3°	
» 32	400			4°	
» 33	500			4°	
» 34	450			5°	
» 35	500			4°	
» 36	500			5°	Disseminazione miliare di piccoli noduli nella milza, nel fegato e nel polmone.
» 37	450			25°	
» 38	300			35°	
» 39	300			30°	
» 40	300	Pane intriso di sangue e visceri di cavie morte di peste.		3°	Niente di speciale tranne una leggiera iperemia intestinale. Esame batteriologico dei visceri e del sangue negativo.
» 41	350			6°	
» 42	450			6°	
» 43	500			7°	Le comuni alterazioni.
» 44	400			6°	
» 45	350			7°	
» 46	350			7°	
» 47	400			45°	

La cavia n. 37 presenta al 4° giorno segni di malessere generale; la 38ª e la 39ª sembrano visibilmente sane. Viene sospeso il trattamento con materiale infetto, vengono poste tutte e tre in una gabbia pulita, e mantenute con cibo ordinario (crusca, avena, erba).

In sesta giornata si manifesta nella prima cavia profusa diarrea sanguigna, ricchissima di b. specifici, che cessa il decimo giorno.

Dopo tale epoca la cavia riprende in parte la consueta vivacità. Notasi però accentuata diminuzione di peso, giacchè mentre pesava prima di essere sottoposta ad esperimento gr. 500, al decimo giorno ne pesa 450.

Tali condizioni generali rimangono immutate fino al 13° giorno, alla quale epoca cominciano a manifestarsi ingorghi delle ghiandole inguinali. L'animale si mostra abbattuto. Al 15° giorno si notano accentuati bubboni inguinali bilaterali, e ingorgo delle ghiandole ascellari e sotto mascellari. Contemporaneamente la respirazione si fa stertorosa e apparisce abbondante scolo nasale ricchissimo di bacilli specifici, e congiuntivite con abbondante essudato purulento, ricco pure di b. pestogeni.

I fenomeni d'infezione generale vanno aggravandosi nei giorni successivi. La funzione respiratoria si compie più stentatamente, finchè l'animale muore al 25° giorno da che manifestaronsi i primi sintomi morbosi.

Reperto anatomo-patologico. — Notasi diminuzione notevolissima di peso, essendo questo ridotto a 3?0 gr. Ingorghi multipli delle ghiandole inguinali, ascellari, sotto-mascellari e cervicali, che si presentano piene di sostanza caseosa e infarcite di bacilli pestogeni.

Rinite e congiuntivite specifica Cavità addominale. Essudato peritoneale fibrino purulento. Iniezione vasale dello stomaco e degli intestini. Ipertrofia delle placche del Payr, specialmente accentuata in una che trovasi in vicinanza di un bubbone addominale grosso come una nocciola.

Ingorghi multipli delle ghiandole meseraiche.

Reni e capsule surrenali emorragici. Milza emorragica e ingrandita. Fegato emorragico. Degenerazione grassa di alcune zone di tessuto epatico. Questi organi appariscono tempestati in tutto il loro spessore di noduli bianchicci, rotondi ben delimitati Forti aderenze pleuodiaframmatiche.

Cavità toracica — Essudato pleurico fibrino purulento. Estese aderenze pleuro diafragmatiche. Polmoni congesti. Disseminazione di noduli caseosi più voluminosi che nel fegato e nella milza. Epatizzazione di porzione del tessuto polmonare. Ingorghi delle ghiandole peribronchiali. Essudato sieroso pericardico.

Esame bacterioscopico. — Innumerevoli bacilli pestogeni nei noduli caseosi. Scarsi negli essudati e nel sangue.

L'altra cavia comincia a dar segni di malessere generale al 4° giorno da che fu sospesa la somministrazione di materiale infetto. La sindrome morbosa si presenta non molto dissimile da quella descritta pel caso precedente.

Manca però la diarrea sanguinolenta.

L'animale mostrasi meno prostrato e meno denutrito di quello dell'esperimento antecedente.

La cavia che pesava 450 gr. avanti d'essere sottoposta a esperimento, ne pesa 420 al 15° giorno da che si manifestarono i primi sintomi della malattia.

Al 25° giorno cominciano a presentarsi i fenomeni d'infezione polmonare, che vanno aggravandosi fino alla morte dell'animale, che avviene al 35° giorno.

Reperto anatomo-patologico. — Non dissimile alle generalità del precedente. I fenomeni polmonari sono più accentuati. Mancano i b. specifici nel sangue.

La 39ª cavia al 3° giorno da che si è sospeso tale trattamento mostra i primi sintomi morbosi.

Al 16° giorno si presentano i fenomeni d'infezione polmonare. L'animale muore nella 30ª giornata. Reperto anatomo-patologico simile a quello delle due precedenti.

Il bubbone addominale, in questa cavia, raggiunge il volume di un grosso uovo di pollo.

La 47ª cavia, ammala al settimo giorno. Le viene sospesa la somministrazione di materiale infetto.

L'infezione decorre cronicamente, come nei casi precedenti.

Al ventesimo giorno appaiono i fenomeni polmonari, che si vanno aggravando sino alla morte dell'animale, che avviene al 4[illegible]° giorno.

Reperto anatomo-patologico. — Notasi estremo dimagramento. La cavia pesava avanti di essere sottoposta a esperimento gr. 500, pesa dopo morta gr. 310.

Le alterazioni anatomo-patologiche, sono simili a quelle notate per gli altri casi a decorso cronico. Notasi di speciale, ingorghi multipli delle ghiandole meseraiche, due delle quali hanno raggiunto il volume di un uovo di piccione, e inoltre, steatosi epatica e maggiore intensità nei fenomeni polmonari. L'apice del polmone destro, è trasformato in una massa caseosa.

All'esame bacterioscopico del sangue, notansi scarse colonie di b. pestogene.

Istituto d'Igiene della R. Università di Roma

Su alcune cause della non coltivabilità dei blastomiceti

INOCULATI NELL'ORGANISMO ANIMALE

RICERCHE

DEL

Dott. O. CASAGRANDI

I.

Dal momento che il gruppo dei Blastomiceti è entrato nel campo della patologia, gli studi su di esso si sono fatti più numerosi.

Stabilita la loro presenza in una serie di affezioni che qui non è il caso di ricordare, si è incominciato anche a vedere quale fosse il destino nell'organismo delle forme blastomicetiche una volta inoculate nello stesso, e si è quindi anche cercato di prendere in esame alcune delle cause della loro distruzione.

La letteratura sull'argomento è assai scarsa: è ben vero che il Bernard [1] riteneva che i lieviti si soffermassero nella vescichetta biliare, che il Grohe [2] trovava ammassi miceliari nel fegato, che il Popoff [3] riteneva una eccezione la moltiplicazione delle cellule dei lieviti nell'organismo, che il Neumayer [4] era pressochè della stessa opinione; ma non è men vero che questi autori sperimentarono con materiali assolutamente impuri e che da ricerche di altri, come, per esempio, della Rabinowitsch [5] risultava che blastomiceti inoculati in cavie, co-

---

1 *Arch. gén. de méd.*, 1848.
2 *Berl. Klin. Woch*, 1870
3 *Berl. Klin. Woch.*, 1872.
4 *Arch. f. Hyg.*, Bd. XII.
5 *Zeitschr. f. Hyg., u Infect*, Bd. XXI.

nigli e sorci erano spesso coltivabili dai medesimi dopo molti giorni. Così pure risultava dalle ricerche di una serie di autori che studiarono l'azione patogena dei blastomiceti rispetto ai tumori.

Recentemente poi l'argomento è stato trattato dallo Iona [1] e dal Gelkinet. [2]

Lo Iona ha praticato inoculazioni endovenose ed endoperitoneali nei conigli con un blastomicete apiculato isolato per caso dall'aria, e ha osservato i fatti che qui riassumo.

In primo luogo iniettando nelle vene dei conigli il sacc. apic l'A. trovò: 1) che dopo 2 ore in un caso, dopo 10 24 negli altri i blastomiceti non si coltivano più dal sangue; 2 che quando dal sangue estratto poco tempo dopo la inoculazione, si otteneva sviluppo di colonie blastomicetiche, questo sviluppo che ordinariamente avveniva dopo 48 ore, era ritardato a 5-6 giorni; 3) che i blastomiceti inoculati non venivano a eliminarsi se non eccezionalmente per la urina, perchè in questa raccolta subito dopo la inoculazione e per più giorni ancora non se ne dimostrava la presenza; 4) che del pari i blastomiceti non si accumulavano e sviluppavano negli organi perchè da questi (milza, fegato, polmoni, reni, capsule surrenali, midollo osseo: non si potevano coltivare i medesimi dopo un tempo relativamente breve 4-30 ore dopo la inoculazione), pure essendo spesso i blastomiceti dimostrabili specialmente nei capillari polmonali e renali.

In secondo luogo iniettando nel peritoneo dei conigli il sacc. apic. l'A. trovò che il materiale blastomicetico si accumulava a grumi a ridosso dell'omento, del fegato, della milza e tra le anse intestinali da dove non emigrava nei linfatici vicini e da dove era coltivabile tutt'al più sino a 21 ore dopo la inoculazione.

In base a queste due serie di esperienze, l'A. concluse che i blastomiceti inoculati nelle vene, vengono uccisi dal sangue e che inoculati nel peritoneo, vengono uccisi per una serie di agenti (umori, leucociti morti, temperatura); ma non però per una azione diretta dei leucociti perchè introdotte gocce di cultura entro cellette di celluloidina nel cavo peritoneale dei conigli, i blastomiceti divenivano incoltivabili senza che i leucociti potessero intervenire.

Il Gelkinet per conto suo sperimentando col lievito di birra, avrebbe osservato: 1) che i blastomiceti iniettati nelle vene dei conigli, dopo 6 ore non sarebbero più dimostrabili negli organi, pure essendo coltivabili nell'acqua di malto dal polmone, dal fegato (non però dal sangue del cuore) dopo 24 ore dall'inoculazione; 2) che in nessun momento essi verrebbero a eliminarsi per le urine; 3) che la scomparsa dei blastomiceti nell'organismo avverrebbe per opera del siero del sangue e sarebbe questa una azione

---

[1] *Rivista di scienze mediche*, Anno XIII.
Arch. de med. exper. et d'anath. path., 1897.

specifica del siero stesso, il quale sarebbe capace di provocarla solo se tenuto a 37° e non sterilizzato, senza che vi intervenga per nulla l'azione dei fagociti, perchè tubi capillari contenenti culture di blastomiceti introdotti nel cavo peritoneale dei conigli dopo 4-12 giorni non mostravano ancora contenere leucociti, e d'altro canto i blastomiceti erano incoltivabili, ecc.

Essendomi da alcuni anni occupato di questo gruppo di forme, ho dovuto più e più volte accorgermi come alcune forme o fossero incoltivabili o lo divenissero in prosieguo una volta inoculate negli animali, ma che prima di potere addivenire a una tale conclusione occorreva estendere assai più le ricerche di quel che non si fosse fatto per il passato.

Riassumerò le mie indagini sul proposito in due gruppi, l'uno riferentesi alla coltivabilità dei blastomiceti nei varii substrati, e l'altro riferentesi alla coltivabilità dei medesimi dall'organismo in cui vengono inoculati.

II.

Le mie prime ricerche sono state dirette a vedere se per i blastomiceti si potesse trovare un terreno adatto al loro sviluppo più che non fossero quelli già in uso. Difatti sino dal 1897 [1] ebbi occasione di sperimentare un numero svarlato di terreni per ricercare fra essi i più atti allo sviluppo dei saccaromiceti, e potei rilevare come in generale male si prestassero all'uopo i terreni minerali zuccherati o no, e meglio quelli che comunemente si usano in bacteriologia zuccherati ed acidificati. Potei anche proporre un terreno speciale il quale, con l'aggiunta di glicerina, che ho sempre successivamente usata, serve assai bene, sia liquido, sia solidificato con agar, o meglio come ora faccio con una miscela di fucus e agar.

Tale terreno ha questa formula: Decotto di patate [2] gr. 1000; Estratto di carne Liebig gr. 20; Peptone secco gr. 10; Glicerina gr. 10; Glucosio gr. 100 cui si può aggiungere, ove occorra, acido tartarico 5-10 ‰. A questo pro-

---

[1] *Riforma medica*, 14 gennaio, 1897.

[2] La preparazione di questo decotto, si può fare in diversi modi, fra i quali non ho trovato finora sensibili differenze. Si può addirittura fare il brodo di patate secondo il metodo dell'Holtz (*Zeitschr. f. Hyg.*, Bd. VIII.) oppure fare una pappa di patate ponendo queste nella autoclave finamente tagliuzzate e con poca acqua e poi prendendo gr. 10 della pappa ogni 100 cc. di acqua, lasciando in fusione per 12 ore e servendosi del liquido decan-

posito va notato, qualora lo si voglia usare solido, che l'acido tartarico occorre aggiungerlo dopo che il terreno già è suddiviso in tubi e sterilizzato, perchè aggiungendolo prima e dovendo poi procedere alle ordinarie ripetute sterilizzazioni, l'agar o il fucus non solidificano più. Per semplificare il procedimento, io anzi, preparo prima il liquido suaccennato senza nè il glucosio, nè l'acido tartarico, lo solidifico con agar (0,50 %) e fucus (5 %), lo divido in tubi in modo che ogni tubo contenga 5-6 cc. di substrato e poi verso in ciascuno di essi, quando il materiale è stato appena tolto dalla stufa e quindi non solidificato, 4-6 gocce di una soluzione sterilizzata bollente di acido tartarico al 10 % e glucosio al 50 %: ripongo ancora una volta il substrato nello sterilizzatore e dopo 10-15 minuti esso è pronto.

Ciò premesso dirò che nella scelta di un substrato per la ricerca dei blastomiceti occorre tenere presenti alcuni fatti relativi ai suoi componenti, alla sua reazione e alla sua consistenza.

Le singole sostanze che a mio avviso possono entrare nella sua composizione, sono: 1) l'estratto di carne di Liebig, che è specialmente adatto a sostituire alcuni dei sali che ordinariamente nelle soluzioni minerali *ad hoc* si trovano, come del resto già praticano alcuni [1]; 2) la glicerina come già per i batteri che difficilmente si coltivano sull'agar, è stato un potente aiuto per ottenerne la coltivazione; 3) il peptone sul quale non fa d'uopo insistere; 4) il glucosio che va preferito agli altri zuccheri non invertiti che si trovano in questa o quella formula senza una ragione plausibile, per quanto il glucosio in alcuni casi potesse sembrare doversi trascurare, conoscendosi che esistono blastomiceti che non hanno proprietà fermentativa alcoolica: però il loro numero è scarsissimo di fronte ai moltissimi che lo posseggono, e del resto non è soltanto per favorire questa particolare attività dei blastomiceti che va intesa l'aggiunta del glucosio; 5) l'acido tartarico o il citrico (a meglio il primo del secondo), poichè è noto che i blastomiceti si sviluppano meglio in substrati acidi che in substrati alcalini, almeno nella generalità dei casi. Ciò non toglie però che l'aggiunta dell'acido possa anche omettersi. [2] In ogni caso se la si fa, si escludano assolutamente gli acidi minerali che dànno pessimi

---

tato, oppure, come uso fare ora, mettendo le patate tagliuzzate finamente con una grande quantità di acqua (10 gr. di patate su 100 e più di acqua) nell'autoclave per 1 ora, lasciando depositare e raccogliendo il liquido decantato. In quest'ultimo modo, oltre ad abbreviare il tempo della preparazione del substrato si ha il vantaggio di far subire subito al materiale una prima sterilizzazione.

[1] Cfr. SCHENK. *Handbuch der Botanik*, 1890.

[2] Vedi sul riguardo a pag. 5.

risultati ; 6) un liquido finalmente nel quale sciogliere queste sostanze, liquido che può essere rappresentato dall'acqua, e meglio dall'acqua potabile che dalla distillata, oppure da svariati infusi o decotti fra cui, come ho già detto, preferisco quello di patata. Va però su questo riguardo notato che allorchè forme blastomicetiche esistenti in un materiale non si possano in alcun modo coltivare, in qualche caso può servire molto bene, come liquido, un infuso o decotto del materiale stesso se esso è solido, o il fluido stesso se liquido. Così mi è riuscito coltivare forme apparentemente incoltivabili dalle feci, sostituendo al decotto di patate l'infuso di feci, e del pari dall'urina, sostituendo allo stesso decotto l'urina, sono riuscito a coltivare forme esistenti in quest'ultima, ma assolutamente incoltivabili in altri substrati.

Per ciò poi che si riferisce alla reazione del substrato, già da tempo è noto in pratica, che i blastomiceti si sviluppano meglio quando il substrato culturale è acido di quando il substrato culturale non lo è più. Però questo concetto nelle ricerche batteriologiche non è così generalizzato come si dovrebbe, dacchè molti sono coloro che credono sia nello isolamento, sia nella coltivazione di blastomiceti ugualmente utili i terreni alcalini e gli acidi.

Quel che si può affermare in proposito è questo, che i blastomiceti abituati a vivere nell'ambiente, si isolano molto più facilmente in substrati acidi che in substrati alcalini: di quelli poi che si trovano nell'organismo umano o animale e che sono suscettibili di essere coltivati, alcuni si isolano più facilmente in substrati acidi che in substrati alcalini e in ogni caso, quelli che su substrati acidi difficilmente si coltivano, del pari difficilmente si coltivano in substrati alcalini, mentre, nei substrati neutri in primo tempo si sviluppano un po' meglio [1].

Gli è perciò che in base a questi risultati la semina dei materiali sospetti contenenti blastomiceti, va fatta sia in substrati acidi che in substrati neutri; i quali ultimi vanno sostituiti ai substrati alcalini, ritenuti quindi come assolutamente pochissimo adatti.

Riguardo alla consistenza del substrato, generalmente nello isolamento dei blastomiceti (specialmente dai tumori), si sono usati i ter-

[1] Queste ricerche sono state praticate seminando 52 materiali contenenti blastomiceti su tre substrati, agar glicerinato glucosato e alcalino, agar glicerinato glucosato neutro; agar glicerinato glucosato e acido, dalle quali ricerche è risultato che sull'agar glucosato e acido si sono sviluppate 42 forme blastomicetiche; sull'agar neutro 32 e sull'agar alcalino 29. Delle 32 sviluppatesi sull'agar neutro 4 hanno costantemente avuto sviluppo rachitico sull'agar così alcalino come acido, mentre nell'agar neutro si sono sviluppate benissimo

reni liquidi e non v' ha dubbio che essi sono ottimi : però ho potuto osservare che i terreni solidi possono in vari casi dare sviluppo di forme blastomicetiche preferibilmente che nei terreni liquidi. Infatti se quei blastomiceti che hanno sviluppo assolutamente rachitico nei terreni liquidi, tanto da finire dopo pochi passaggi a esaurirsi, nei terreni solidi formano qualche colonia, non è difficile dalle medesime dopo successivi passaggi ottenere culture fiorenti. In rapporto con tale fatto, ho potuto vedere, che questi blastomiceti nei terreni liquidi facilmente perdono il glicogeno e i loro nuclei non si possono mettere in evidenza, mentre corrispondentemente nei terreni solidi le forme con glicogeno sono più numerose e le forme in cui non si trovano forme nucleari sono meno numerose. [1]

V' ha dippiù, io sono d'avviso che non debba mai trascurarsi d'innestare i terreni solidi quando si faccia la ricerca dei blastomiceti da tumori, perchè in questi casi se nei liquidi si ha risultato positivo, si è assai spesso propensi a credere che la forma blastomicetica sviluppata vi sia caduta dall'aria, ciò che, in alcuni casi, nei terreni solidi può venire escluso assolutamente soltanto tenendo presente il numero delle colonie sviluppatesi. L'obbiezione fatta che nei medesimi si possono facilmente verificare inquinamenti dall'aria, perde poi di valore quando invece di servirsi delle lastre del Koch, che del resto dovrebbero assolutamente scartarsi, o delle capsule del Petri che ordinariamente si adoperano, ci si serva di grandi provettoni il cui il terreno si fa solidificare a corto becco di flauto.

In quanto poi al materiale che può servire per solidificare il substrato liquido, a parte la gelatina (che pure essendo di più facile maneggio [2] non permette che le culture si possano porre nel termostrato, nè che vi si innestino materiali fluidificanti per es., le feci) va preferito l'agar o meglio il *fucus crispus* (il quale ultimo già di per sè solo al 5 °/₀ è un buon terreno di cultura per i blastomiceti). Si può anche rendere il substrato solidificato con *fucus*, decisamente consistente (ciò che col solo *fucus* non si può ottenere) aggiungendo un po' d'agar come ho già fatto rilevare.

III.

In una abbastanza lunga serie di conigli (132 animali) verso i quali saggiai l'azione di diversi blastomiceti isolati da feci umane, inoculai

---

[1] Non insisto su queste circostanze che saranno a suo tempo chiarite, in altro lavoro.

[2] Essa può servire nelle gocce pendenti per impedire che le colonie che si formano cadano al fondo della goccia.

sistematicamente sotto cute 2 cmc. di una emulsione in acqua distillata sterilizzata di una patina dei medesimi coltivati per 2-3 giorni su agar-agar glicerinato glucosato e acido, e dopo la morte degli animali, avvenuta o provocata violentemente dopo 20 giorni dalla inoculazione, innestai i vari organi raccolti con tutte le possibili cautele nei terreni già da me indicati, per vedere se nei medesimi si ottenesse sviluppo di colonie dei blastomiceti isolati.

Quando il risultato era positivo si sottomettevano i blastomiceti isolati a un accurato studio morfologico e biologico, per vedere se risultava l'identità loro coi blastomiceti inoculati, lavoro questo che per quanto laborioso e paziente, si rendeva necessario per non incorrere da un canto in tutta quella serie di errori in cui cadono spesso coloro che affermano di avere isolati dai tessuti microrganismi diversi da quelli inoculati, e persistono con tutto ciò a volere coi medesimi identificarli, adducendo magari possibili indimostrabili morfologiche trasformazioni, e dall'altro per non cadere nell'errore inverso, credendo cioè di avere isolato le forme inoculate senza che con queste ultime le nuove abbiano alcuna relazione.[1]

Dai risultati ottenuti con l'innesto nei terreni culturati degli organi di conigli inoculati con sette diverse forme blastomicetiche, osservai che dalle ghiandole sottocutanee in sei casi su nove potei isolare uno dei blastomiceti e in tre su otto un secondo blastomicete, il quale fu altresì coltivabile in due casi su otto dal fegato.[2]

Vi sono quindi dei blastomiceti i quali inoculati sottocute nei conigli possono dagli organi isolarsi anche dopo venti giorni dall'inoculazione.

---

[1] Su questo riguardo non posso far ammeno di notare come con straordinaria facilità oggidí chi isola blastomiceti in base ai caratteri di poco o nessun valore (forma per esempio, aspetto delle colonie a piatto), affermi di aver isolato da questo o quel materiale questa o quella forma di blastomicete già nota. Il lavoro di identificazione è tutt'altro che semplice: di questo dovrebbero persuadersi tutti i ricercatori di blastomiceti, prima di essere tanto corrivi nell'affermare l'identità o la differenza delle forme E questo, sia detto per incidenza, vale pure per lo studio degli *oidi* e in particolar modo per quello dell'*oidium albicans* che molti trovano dappertutto appunto perchè descrivono per *oid. alb.* qualunque oidio, essendo identici i caratteri morfologici.

[2] Queste culture furono fatte contemporaneamente su substrati diversi, e dai risultati ottenuti apparve evidentissima l'importanza dell'uso di substrati adatti, in quanto che mentre rimanevano sterili i comuni substrati batteriologici solidi alcalini, e pochissime colonie si sviluppavano in quelli solidi acidificati, in quelli glucosati e acidi lo sviluppo era assai più abbondante (non mai meno di 4 colonie, massimo 15 colonie).

Però è evidente che havvene un numero anche più notevole da quello che a me risulta, il quale, non si sviluppa più.

E le esperienze praticate per la via endoperitoneale e per la via endovenosa, sebbene non fatte con tutte le forme suindicate, parrebbero controllare perfettamente quelle fatte sottocute, come risulterà da quanto in seguito dirò.

Egli è certo dunque che nell'organismo animale forme inoculate divengono incoltivabili, fatto questo che secondo le ricerche dello Jona e del Gelkinet dovrebbesi a un'azione blastomiceticida del siero del sangue (Jona, Gelkinet), ad un'azione mista dei globuli bianchi morti, degli umori e della temperatura (Jona), e che, secondo quanto a me consta, deriva anche da altre cause di cui alcune intimamente connesse alle condizioni di vitalità e resistenza in cui si trovano le cellule, e altre dovute a modificazioni morfologiche speciali delle cellule stesse entro l'organismo, modificazioni che si legano finora alla incoltivabilità delle stesse.

1. Avevo già avuto occasione di osservare che iniettando alcuni blastomiceti nelle vene dei conigli, alcuni degli animali non morivano, e gli altri soccombevano non prima di quelli che venivano inoculati o sottocute o per la via endoperitoneale, e che se nei medesimi animali si faceva la ricerca dei blastomiceti dal sangue del cuore dopo tre giorni dall'inoculazione, si aveva costantemente esito negativo.

Lo Jona e il Gelkinet dai loro esperimenti sul *sacc. apic.* il primo, sul lievito di birra il secondo, vengono poi a dedurre che realmente lo isolamento dal sangue del cuore dei conigli cui siano stati inoculati blastomiceti nelle vene, non si può fare più dopo poche ore dalla inoculazione. E il Gelkinet specialmente dà la dimostrazione del fatto avendo osservato che i blastomiceti innestati in gocce pendenti di siero di sangue non sterilizzato tenuto a 37° muoiono in pochi giorni, mentre ciò non succede quando il siero viene tenuto alla temperatura ordinaria o è sterilizzato.

Dal canto mio ho praticato l'innesto di quindici forme blastomicetiche diverse in tubi contenenti 5 cmc. di siero di sangue di bue non sterilizzato e tenuto a 37° entro i tubi medesimi. Da questi tubi poi a varii lassi di tempo ho fatti innesti nei miei terreni, e ho potuto vedere che soltanto cinque forme dopo otto giorni erano divenute incoltivabili, dopo dieci giorni altre due, e che le altre forme dopo venti giorni erano ancora vive. Ripetute contemporaneamente gocce pendenti in siero innestate coi medesimi blastomiceti, è ben vero che soltanto in quattro forme su quindici notai al microscopio sensibile sviluppo per tre giorni, ma però tutte innestate da queste gocce pendenti

in altre gocce pendenti del mio terreno liquido gelatinizzato, diedero fino a dieci giorni sviluppo di colonie e anche rigoglioso, così come quelle ottenute dai tubi di siero. Dopo questo tempo cominciarono a essere incoltivabili due delle cinque forme già precedentemente dimostrate incoltivabili per il soggiorno di una settimana nei tubi di siero e poi successivamente le alre tre [1].

Realmente quindi nel siero di sangue non sterilizzato tenuto a 37°, un certo numero di forme blastomicetiche divengono incoltivabili in un tempo più o meno lungo; ma non tutte, però, e anche qui la scelta del terreno culturale adatto ha la sua importanza.

Esperienze di controllo fatte con siero di sangue sterilizzato e con liquido ascitico non sterilizzato o sterilizzato, mi hanno dato sempre risultato positivo riguardo alla coltivabilità delle quindici forme innestate.

Dopo di che io credo si possa realmente ritenere che il siere di sangue rende incoltivabili dei blastomiceti. Però non si può affermare che quest'azione si eserciti ugualmente e nello stesso tempo su tutte le varie forme blastomicetiche.

2. Ciò premesso, hanno ora le altre cause addotte dagli AA. importanza nella incoltivabilità delle cellule blastomicetiche?

È stato, come ho già detto, lo Iona, che ha affermato come una volta che i blastomiceti vengono inoculati nel peritoneo, si stabilisce una leucocitosi notevolissima, e nella lotta i fagociti restano distrutti, ma ciò che ne rimane tiene avvinti, conglobati i parassiti, ehe perciò non possono disseminarsi nel peritoneo. L'arresto della loro vitalità può darsi ehe sia indipendente dall' inclusione subita, ma ne dipende almeno in parte una serie di modificazioni che i blastomiceti vanno a subire ulteriormente; modificazioni le quali sono dovute a più cause che tutte concorrono a distruggere la vitalità dello elemento e che sono rappresentate dalle condizioni fisiche dell'ambiente, dalla azione degli umori e da quella dei leucociti.

Ora, senza entrare nel merito intimo delle quistioni messe avanti dall'Iona, certo si è che indiscutibilmente ho potuto isolare tutti i blastomiceti (8 forme) inoculati nel cavo peritoneale dei conigli (40 animali) sino a cinque giorni dopo la inoculazione, e v' ha di più, li ho ancora isolati dopo 10 giorni dalle ghiandole meseraiche in tutti i casi e in 31 su 40 dalle ghiandole mediastiniche.

---

[1] Ulteriori ricerche non credetti opportuno di dover praticare perchè sufficienti queste per un controllo; del resto il seguire centinaia di culture a goccia pendente mentre sarebbe stato troppo laborioso, non avrebbe poi portato serî vantaggi.

Dimodochè pure ammettendo che vi possano essere forme blastomicetiche che inoculate nel peritoneo dei conigli possano prima delle altre divenire incoltivabili, gli è certo che tale fatto non si verifica sempre così rapidamente come lo Iona ottenne per il suo sacc. apiculatus e che d'altro canto la loro penetrazione e dimora nel sistema linfatico avviene indubbiamente, sebbene il Gelkinet neghi questo fatto, per il lievito di birra inoculato nel cavo peritoneale.

Nè d'altro canto posso convenire collo Iona che la temperatura intorno ai 40° favorisca questa incoltivabilità dei blastomiceti, sebbene risulti da sue esperienze che avendo introdotto nel peritoneo tubetti di vetro contenenti qualche goccia di cultura e chiusi alla lampada, dopo un paio di giorni non era più possibile ottenere da quel materiale sviluppo di cultura, e ciò perchè innestando 5 forme blastomicetiche in brodo, e tenendo queste, ovvero pezzetti di tela o fili di seta impregnati di culture, a 40° nel termostrato, ho potuto dalle medesime, ottenere culture nel mio substrato solido dopo 5-8 giorni.

Sono quindi convinto che tali risultati dipendono, almeno in gran parte, dalla scelta del terreno di cultura, sebbene altri fattori vi possano essere fra essi, ad alcuni dei quali passo ora ad accennare.

3. È da tempo che potei osservare che se una data forma blastomicetica, viene da un terreno adatto seminata in un terreno poco adatto, in quest'ultimo, come è del resto naturale, il numero delle colonie che si sviluppano è di gran lunga inferiore a quelle che si sviluppano nel primo e che se successivamente si passano da terreno poco adatto in altro simile o identico, si può finire col perdere addirittura la cultura, senza che sia possibile, anche dopo passaggi in terreni adatti, ottenere la ripristinazione delle culture, mentre corrispondentemente le culture sopra substrati adatti della stessa forma blastomicetica sono sempre fiorenti e si ripetono di passaggio in passaggio. Studiando accuratamente le cellule delle une e delle altre culture, ho potuto osservare che mentre fra le prime vanno sempre più diminuendo le forme contenenti glicogeno e comparendo le forme in cui figure nucleari non si possono mettere in evidenza, nelle altre, le forme contenenti glicogeno, si trovano sempre come normalmente e le forme con figure nucleari sono la maggior parte inalterate. [1]

Ora, ripetendo le medesime osservazioni sugli stessi blastomiceti inoculati sottocute ai conigli, nel sito stesso della inoculazione, mi sono potuto convincere che ivi si verifica lo stesso fatto per cui le forme in breve divengono incoltivabili.

---

[1] V. nota 1ª a pag. 6.

D'altro canto, inoculando blastomiceti nel cavo peritoneale dei conigli e facendo dopo 2-3 giorni culture a goccia pendente dal materiale raccolto, ho potuto osservare che certe forme, bene descritte dallo Iona, sono o incapaci di gemmare, o danno appena una gemma la quale non cresce o se cresce e gemma ancora, non è poi capace di un ulteriore sviluppo. Queste forme hanno certamente somiglianza con quelle che si trovano in alcuni tumori, i quali, innestati comunque, danno risultato negativo, nonostante che la ricerca istologica abbia dato risultati positivi.

Così, per dare altri esempi, il blastomicete che io isolai, [1] e dimostrai essere capace di produrre il vaiolo dei polli, una volta modificatosi entro le cellule non è più capace ulteriormente di essere coltivato. E ora posso aggiungere che del pari il corpuscolo del mollusco contagioso dell'uomo, non è suscettibile di essere coltivato, come risulta da una lunghissima serie di tentativi da me fatti, per quanto esso, inoculato sulla pelle di uomini, specialmente se predisposti, come a suo tempo riferirò, sia capace di dare luogo a noduli di mollusco. [2]

IV.

Ed ora, riunendo insieme i dati risultanti dal fin qui detto, si possono trarre le seguenti conclusioni:

1. Perchè possa affermarsi che i blastomiceti inoculati nell'organismo animale non siano più coltivabili dagli organi, occorre che questi ultimi vengano innestati in terreni adatti, potendo i comuni terreni sinora usati in bacteriologia rimanere sterili.

2. I blastomiceti inoculati nell' organismo animale e divenuti incoltivabili, vengono realmente resi tali per opera del siero del sangue che ha indubbiamente tale azione, in un tempo più o meno lungo, se fresco e alla temperatura del corpo: questa, i leucociti, i transudati (liquido ascitico), non hanno in generale una azione sui blastomiceti così evidente come è quella del siero del sangue.

---

[1] *Rif. med.*. n. 265, 1896.

[2] Vale qui la pena di fare notare come, alcuni che hanno affermato di avere isolato blastomiceti da noduli di mollusco, siano caduti nell'errore di aver isolato blastomiceti dalla pelle (sulla quale si trovano diverse forme di cui quelle accidentali sono sempre coltivabili) credendo di averli isolati dai noduli stessi.

3. I blastomiceti si rendono incoltivabili dall'organismo animale quando nell'organismo si ripete quel fatto che fa a volte perdere la loro ordinaria coltivabilità nelle culture, cioè la dimora in substrato poco adatto e quando soggiacciono a speciali modificazioni nella loro apparenza morfologica (alcune forme che si trovano nei tumori — corpuscoli del vaiolo dei polli — modificazioni che ciò non ostante non possono ritenersi sempre legate anche alla perdita della loro vitalità.

Roma, 10 maggio 1898.

Istituto d'Igiene sperimentale della R. Università di Roma.

SULLA DIAGNOSI DIFFERENZIALE DEI BLASTOMICETI

RICERCHE

DEL

Dott. O. CASAGRANDI

È da tempo che tanto i botanici, quanto gli studiosi dei blastomiceti dal punto di vista industriale, si sono occupati e si occupano di selezionare l'una dall'altra ciascuna forma blastomicetica che trovano nell'ambiente.

Alle prime ricerche dell'Hansen [1] devesi lo isolamento di sei forme con caratteri ben definiti, e anche di altre forme blastomicetiche. Vennero poi molti autori, i quali cercarono di addurre dei caratteri più o meno spiccati per le forme che andavano studiando. Così è che la letteratura blastomicetica si è arricchita di un numero notevole di forme, la cui descrizione particolareggiata è per lo più sparsa in lavori speciali, ma non venne presa nei trattati che in assai piccola parte.

Un numero discretamente notevole di tali descrizioni ho potuto durante quest'ultimo triennio, dacchè mi occupo di blastomiceti, prendere in considerazione, ed è precisamente dallo studio di esse che mi sono dovuto accorgere della difficoltà addirittura enorme che nella maggioranza delle volte si incontra qualora si vogliano con le specie o le forme già note identificare forme che si vadano dall'ambiente isolando. Questa difficoltà va riferita vuoi allo studio imperfetto e generalmente unilaterale fatto dai vari autori sui blastomiceti già noti, vuoi alla mancanza di caratteri veramente importanti e fissi per ogni singola forma di blastomicete.

[1] Cfr. *Compt. rend. d. Laboratoire Carlsberg.* — Queste ricerche trovansi riassunte anche in diversi lavori. Cfr. sul proposito *Les microrganismes de la fermentation* par A. JÖRGENSEN, 1895.

I. Criteri analitici messi avanti da vari autori per differenziare le singole forme blastomicetiche.

A. Criteri dell' Hansen.

L' Hansen, come è noto, riteneva che i dati principali costituenti caratteri differenziali tra un blastomicete e un altro, fossero i seguenti:

1) l' immagine microscopica delle cellule;
2) la formazione delle ascospore;
3) la formazione del velo;
4) i limiti di temperatura;
5) le culture su mezzi solidi;
6) l'azione sugli zuccheri e altri costituenti dei liquidi nutritivi.

Nessuno potrà, prima di ogni altro, negare come questi dati siano stati messi così l'uno accanto all'altro senza ordine preciso. Ma non solo: se noi prendiamo a esaminare una ad una le vedute dell'Hansen intorno a ciascuno dei caratteri suddetti, ci accorgeremo subito che mentre da un canto ad alcuni di essi attribuisce una importanza straordinaria, ad altri gliela scema moltissimo in base a dati che oggidì non possono più ritenersi esatti. Ecco infatti quel che mi risulta sul proposito.

I). *Sulla immagine microscopica delle cellule dei blastomiceti.* — L' Hansen, non v'ha dubbio, è stato il primo a dimostrare una variabilità nella forma delle cellule blastomicetiche così grande e marcata da impedire di potere realmente su di essa fondarsi per ricavarne caratteri differenziali.

Però l'A. che poteva avere ragione fondando le sue conclusioni sullo studio delle cellule blastomicetiche coltivantisi in terreni liquidi, non si è preoccupato di ricercare se realmente nei blastomiceti si possa osservare una forma che in determinate condizioni si mantenga in massima abbastanza costante. Ora, siccome ciò si può sino a un certo punto avverare, come dirò in seguito, ne segue che il fatto messo in luce dall' Hansen non può ritenersi un postulato, e che all'immagine microscopica delle cellule non bisogna togliere del tutto un valore differenziale.

2). *Sulla formazione delle ascospore.* — L'importanza della forma ascofora nei blastomiceti è certamente dal punto di vista botanico molto importante a rinvenirsi. L'Hansen quindi le diede giustamente valore: però non si possono distinguere i blastomiceti in due gruppi: l'uno rappresentato dai *veri saccaromyces* facenti spore e l'altro dai *non saccaromyces*, ossia blastomiceti non facenti spore, perchè si

può ritenere assodato che un blastomicete ritenuto un *non saccaromyces* può, in condizioni speciali o no, formare spore, e cosí divenire un *saccaromyces* e, viceversa un *vero saccaromyces* perdere la proprietà di fare spore e divenire un *non saccaromyces*.

Sono poi assolutamente da mettere da parte le ricerche circa il massimo e minimo limite di temperatura per la produzione delle spore, perchè del tutto prive di praticità, e perchè dànno, nei medesimi casi controllate, risultati inconstanti. [1]

3) *Sulla formazione del velo.* — L'Hansen osservò che nei terreni liquidi zuccherati, alcuni blastomiceti si sviluppavano sulla superficie del liquido, formando una pellicola superficiale, la quale era completa dopo un determinato numero di ore a un data temperatura, ed era suscettibile di formarsi tra un limite massimo e minimo di gradi per ogni blastomicete.

Ora, pure non disconoscendo la importanza della formazione del velo nei blastomiceti, non si può, d'altronde, attribuirle tutta quella importanza che vuole l'Hansen, sia perchè può accadere che i *saccaromyces* che non hanno fatto velo per vario tempo poi si decidono a farlo, sia perche è dimostrato (Sanfelice)[2] che alcuni blastomiceti che non fanno assolutamente velo nei terreni artificiali zuccherati, lo fanno poi nei liquidi naturali zuccherati, per es., nei succhi di frutta.

Anche il Peglion [3] in una serie di ricerche ultimamente fatte sui lieviti del vino ha, per es., osservato che, quando le prove venivano fatte con mosto diluito, l'unico accenno a formazione di veli era dato da un anello che il lievito formava alla periferia della falda liquida a

---

[1] Il Cuboni e il Pizzigoni scrivono, a conferma di quanto dico, sul proposito: « Dei criteri analitici suggeriti dall'Hansen. quello basato sulla quantità di tempo necessario alla formazione delle ascospore ad una temperatura determinata, non ci ha dato risultati molto attendibili, giacchè nei diversi fermenti da noi provati, i tempi erano ben poco diversi e mal si saprebbe definire se le piccole differenze trovate dipendano dalla natura specifica dei vari fermenti o piuttosto da altre circostanze che sfuggono all'osservatore. Ad un risultato consimile era giunto anche il Forti che sperimentando sopra lieviti di vino di Nebbiolo, Barbera, Asti e Conegliano, trovò che i limiti di tempo necessario per la formazione delle ascospore non erano molto differenti, anche in varietà che dal punto di vista zimologico, dovevano ritenersi ben distinte.

Anche coll'esame del modo di germinazione delle ascospore non siamo riusciti a trovare diversità tali da poterne trarre caratteri distintivi per le diverse specie o varietà ».

[2] Questi Annali, Vol. IV.

[3] *Sui lieviti del vino.* — Modena 1898.

contatto dell'aria, mentre adoperando una soluzione nutritiva artificiale, poteva ottenere più facilmente veli dai lieviti elittici e pastoriani da lui studiati.

Dippiù, il Peglion ha osservato che la presenza di mannite induce una produzione più sollecita del velo, il quale si formerebbe anche nelle culture in mosto comune e con lieviti che in condizioni ordinarie non presentano tracce di esso.

Infine, la ricerca del massimo e minimo limite di temperatura per la formazione del velo presenta gli stessi difetti di quella per le spore e non credo necessario insisterci ulteriormente.

4) *Sui limiti di resistenza.* — L'Hansen accenna anche per qualche blastomicete ai limiti di resistenza. Però i dati sul proposito messi avanti dall'A. sono assolutamente insufficienti, non essendo stati raccolti secondo un metodo razionale, come esigono le odierne conoscenze di tecnica batteriologica. Non insisto del resto su ciò dal momento che in ulteriori lavori di altri (Cadeddu, Fermi e Pomponi) ciò è stato fatto.

5) *Sulle culture in terreni solidi.* — Oggidì che le indagini batteriologiche per mezzo delle culture su terreni solidi sono così progredite e hanno condotto ad importanti differenze fra schizomicete e schizomicete, era naturale che anche ai blastomiceti dovesse estendersi tale ricerca. Eppure l'Hansen attribuì ad esse importanza del tutto secondaria! Va del resto notato che egli si serviva unicamente della gelatina di malto, e che ulteriori ricerche (Sanfelice) hanno cercato di riempire questa lacuna.

6) *Sull'azione sugli zuccheri.* — L'azione dei blastomiceti sugli zuccheri è veramente quella che ha maggiormente attirata l'attenzione dell'Hansen. Del resto le ricerche sul proposito sono state riprese, e, possiam dire, esaurite da una lunga serie di autori. Così, ad esempio, un indirizzo veramente completo (quale però può far parte solo di lavori speciali) l'hanno dato il Fischer e il Thierfelder[1] studiando l'azione di blastomiceti sopra moltissimi zuccheri.

Di guisa che, conchiudendo, i dati messi avanti dall'Hansen non possono accettarsi per differenziare una forma dall'altra di blastomicete:

1) perchè disposti senz'ordine;

2) perchè ad alcuni di essi è attribuita importanza superiore a quella posseduta, e ad altri è scemata di troppo;

---

[1] *Ber. d. deut. chem. Gesell* Bd. XXVIII.

3) perchè fra di essi ve n'ha alcuni che possono bensì essere oggetto di ricerche speciali, ma non mai entrare nell'indole di ricerche generali e possibilmente anche pratiche.

B. — Criteri del Sanfelice e di altri osservatori.

I dati messi avanti dall' Hansen, non vennero egualmente da tutti gli autori tenuti in considerazione nello studio di determinate forme blastomicetiche. Vi furono infatti alcuni che si occuparono di stabilire dei caratteri molto più semplici sui quali fondarsi per differenziare una forma dall'altra. Si fecero così classifiche a base della sola forma delle cellule, a base dell'azione degli zuccheri ecc., senza parlare poi della classifica del tutto industriale a base della provenienza dei blastomiceti o dell'uso industriale loro.

Fu il Sanfelice quello che nel 1894 [1] riconoscendo la deficienza di criteri per distinguere una forma blastomicetica dall'altra, e avendo isolati vari blastomiceti dai succhi di diversi frutti, abbandonò nel loro studio la guida seguita dall'Hansen e dagli altri per tenere quello stesso ordine che seguesi in batteriologia per lo studio degli schizomiceti, riuscendo dopo ciò a collocare in sei gruppi distinti l'uno dall'altro i blastomiceti da lui isolati.

Dalle ricerche di questo A. si potè quindi venire a dimostrare la possibilità di riunire determinate forme blastomicetiche in gruppi, i quali potranno diventare più o meno numerosi, giacchè non tutte le forme blastomicetiche che si vanno studiando possono rientrare nei sei gruppi fondamentali del Sanfelice.

Ricerche comparative ancora più minute, tendenti cioè a distinguere propriamente una data forma blastomicetica da un altra, (prima del Sanfelice) erano però state fatte dal Cuboni e Pizzigoni [2]. Questi A. studiarono i fermenti del vino di Barolo, e poterono in base al modo di svilupparsi delle colonie sulle piastre di gelatina al mosto di uva, differenziare tre forme di blastomiceti.

Ultimamente poi il Peglion, nel lavoro già citato sui lieviti del vino, si è servito per lo stesso scopo: 1) di culture in strie sopra gelatina, agar al mosto, patate, barbabietole; 2) di culture in mosto naturale ed artificiale; 3) di culture in colonie giganti col metodo di Lindner. Egli è venuto alla conclusione che mentre è agevole nelle prime semine sepa-

---

[1] Loc cit

[2] Staz. agrarie sper. ital. 1893.

rare per es., i lieviti elittici in base al carattere delle colonie indicate dal Cuboni e Pizzigoni, relativo al contorno liscio o variamente intaccato, quando, dopo fatte parecchie culture in mosto, si rinnovano le culture in scatole di Petri, si ottengono facilmente risultati affatto incostanti; le colonie che si sviluppano non essendo più sempre del tipo a contorno liscio od arceolato. E secondo l'A., presso a poco lo stesso succede quando si studiano le colonie giganti di varie razze di provenienza diversa: difatti mentre alcune specie ben determinate (*sacc. pastorianus, farinosus, anomalus*) hanno fornito costantemente delle colonie giganti caratteristiche, le razze selezionate dai vini, che offrivano una certa divergenza di forma, dopo di essere state coltivate per alcune generazioni in condizioni di sviluppo uniformi, riprodotte in colonie giganti, hanno dato delle forme le quali sempre più tendevano ad uniformarsi e corrispondere a pochi tipi. Finalmente secondo l'A. le colture in stria sopra varii substrati portano alle stesse conclusioni.

Per ciò poi che si riferisce alle culture in liquidi, non avrebbero offerto differenze molto notevoli, tanto dal punto di vista del tempo che impiegano a formare il velo, quanto per le forme che in essi assumono le cellule. Così pure i caratteri del deposito, il quale potrebbe distinguersi in un deposito grumoso e in deposito polverulento, subirebbero delle variazioni per quanto però meno frequentemente.

II. — Criteri da seguirsi per differenziare le singole forme blastomicetiche.

Avendo isolato una serie di blastomiceti dallo ambiente e dagli animali, e volendo trovare il modo di identificarli o differenziarli tra di loro e da quelli già noti, li ho sottomessi a uno studio particolareggiato e ordinato, dal punto di vista morfologico e biologico. Da cosifatto studio ho potuto derivare i dati che passo ad esporre.

A. — Considerazioni sulla scelta dei terreni di cultura.

1. *Terreni adatti alla ricerca dei blastomiceti.* — In altro lavoro ho già fatto rilevare, come avendo usati, per la ricerca dei blastomiceti dall'ambiente e dall' organismo animale, terreni liquidi e solidi i più diversi, mi fosse risultato che poco bene servivano i comuni terreni a base di sali minerali, sia liquidi, sia solidi, e i comuni terreni batteriologici, e che invece mi si erano mostrati più adatti i terreni glucosati

e acidificati. Diedi anzi una formula per un terreno nel quale riuscii a coltivare un numero rilevante di forme blastomicetiche.

Torno ora a insistere sulla necessità di ricorrere a terreni adatti allo sviluppo dei blastomiceti, al fine di evitare quella non piccola serie di obbiezioni che lo studioso dell'argomento è in dovere di fare a coloro che per isolare blastomiceti si servono solo di comuni terreni utili allo sviluppo degli schizomiceti. Consta a me che esistono nell'ambiente blastomiceti che non si sviluppano affatto in questi terreni, mentre si sviluppano in altri o nei medesimi glucosati e magari opportunamente acidificati.

Recentemente[1] ho ripresa la questione e ho indicato i terreni di cultura adatti alla ricerca dei blastomiceti. Non credo quindi doverci insistere ulteriormente. Dirò soltanto che il terreno di cui mi servo è così composto: Brodo di patate 1000, estratto Liebig 20, peptone 10, glicerina 20, acido tartarico (volendo acidificarlo) 10. Questo terreno si può rendere solido con l'aggiunta di agar-agar 2-3 °/₀ o meglio con una mescolanza di agar 0,50 °/₀ e fucus crispus 5 °/₀. Non uso la gelatina perchè non permette di servirsi del termostato e perchè spesso occorre o innestare materiali contenenti anche schizomiceti fra cui ve ne possono essere dei fluidificanti o innestare materiali contenenti enzimi proteolitici (feci, p. es.) i quali determinano la fluidificazione della gelatina senza potersi ottenere lo scopo di coltivare i blastomiceti che nel materiale possono contenersi.

2. *Terreni adatti allo studio dei caratteri culturali dei blastomiceti.* — Allorchè i blastomiceti sono stati isolati, per metterne in evidenza i loro caratteri culturali, io sono d'avviso essere perfettamente inutile ricorrere a terreni speciali, come p. esempio all'acqua di malto gelatinizzata, alle varie gelatine, ecc. dal momento che ci si può benissimo servire di gelatina, agar e brodo usati in batteriologia, con qualche lieve modificazione nella loro preparazione. Usando questi terreni, anzi tutto si rende lo studio morfologico dei blastomiceti più alla mano, oltre di chè si rende possibile istituire paragoni col modo di sviluppo degli altri microrganismi che in questi terreni si coltivano.

Il metodo da me seguito consiste:

1) nel praticare infissioni in gelatina al brodo di Löffler, generalmente senza la usuale alcalinizzazione con soluzione satura di carbonato sodico.

2) nel praticare strisciamenti su agar-agar glicerinato leggermente

[1] Questi Annali: questo fascicolo.

alcalino e sul medesimo coll'aggiunta ogni 6 cc. di 4-6 gocce di una soluzione di acido tartarico al 10 °/₀ e glucosio al 50 °/₀.

3) nel praticare innesti su patate tagliate a dischi e poste in scatole di Petri, secondo il metodo di Bolton e Globig.

4) nel praticare innesti in brodo di Löffler coll'aggiunta ogni 6 cc. di 4-6 gocce di una soluzione di acido tartarico al 10 °/₀ e di glucosio al 50 °/₀.

Ciò premesso dirò riguardo a questi terreni che:

1) scelgo la gelatina non alcalinizzata perchè oltre all'essere in essa lo sviluppo delle colonie più rapido, i caratteri delle colonie stesse e e specialmente quelli dei bordi rimangono più costanti e perchè quando si tratta di culture per infissione, quelle forme che danno barbe, non modificano sensibilmente questa loro proprietà, al contrario di quel che succede usando terreni alcalinizzati sia pure anche provvisti di glucosio che favorisca lo sviluppo dei blastomiceti;

2) scelgo sia l'agar leggermente alcalino che quello acido e glucosato perchè spesso, come vedremo in seguito, vi sono blastomiceti che nell'uno formano una patina umida e limitata, mentre nell'altro la formano asciutta e diffusa, cioè assolutamente diversa;

3) scelgo il brodo di Löffler acidificato e glucosato, perchè il solo brodo di Löffler è del tutto inadatto allo sviluppo dei blastomiceti, o almeno questo se avviene, è così rachitico da non poterne trarre risultati, specialmente per quello che si riferisce alla produzione del velo.

B — Considerazioni sull' aspetto microscòpico delle cellule blastomicetiche.

Lo studio dello aspetto microscopico delle cellule blastomicetiche, per essere completo, deve farsi sia osservando il materiale di culture su diversi substrati, sia osservando il materiale nel sito stesso da cui venne isolato.

Partendo da questo concetto, e seguendo un indirizzo esatto, si riesce, a mio avviso, a distinguere in ciascun blastomicete una forma, dirò così tipica, e una forma atipica.

La ricerca della forma tipica è stata quella che mi ha costretto maggiormente a un lungo lavorìo di controllo. A mio avviso può intendersi come tale quella che presentano le cellule blastomicetiche coltivate sull'agar acido e glucosato, poichè ivi, una volta che i blastomiceti si sono educati a vivere non mostrano, almeno in mas-

sima, quelle modificazioni che si osservano per esempio nei sustrati liquidi. [1]

Ora in base alla forma delle cellule blastomicetiche osservate su terreni solidi, io credo si possano distinguere i blastomiceti in:

1) Blastomiceti a cellule *sferiche* (viste in sezione ottica *rotonde*); (Fig. 1ª).

2) Blastomiceti a cellule *ovoidee* (viste in sezione ottica *ovali*) più o meno allungate sino a divenire *elissoidee* (viste in sezione ottica *elittiche*); (Fig. 2ª).

3) Blastomiceti a cellule *apiculate* od *a limone* (cellule ovalari coi poli appuntati) (Fig. 3ª).

4) Blastomiceti a cellule *piriformi* (cellule ovalari con un polo più stretto dell'altro) (Fig. 4ª).

5) Blastomiceti a cellule *a boudin*, o a tubo, o a cilindro (cellule allungate a pareti parallele e a poli rotondeggianti (Fig 5ª).

La ricerca della forma atipica va fatta nel materiale primitivo e in vari substrati culturali, fra cui nei substrati liquidi. Tale ricerca presenta spesso grandi difficoltà vuoi per la tecnica, vuoi per la scarsezza delle forme e volta per volta può presentare fatti nuovi degni di essere descritti. È invece interessante, dal punto di vista della diagnosi differenziale dei blastomiceti, conoscere quale forma le cellule assumano nei terreni liquidi, allorchè si è in presenza di quelle forme che sono capaci di formare il velo.

Già ho detto che l'Hansen ha dimostrato per primo, ed ogni osservatore poi lo ha confermato, che la forma dei blastomiceti formanti velo nei terreni liquidi si modifica sensibilmente. Le cellule si allungano e si dispongono serialmente, e si hanno così quelle specie di ramificazioni che ricordano gli ifi, benchè a mio vedere di ifi nello stretto senso della parola non debba parlarsi, mancando la fusione delle pareti cellulari nei punti dove cellule e cellule stanno in contatto. [2]

[1] Per es. tenendo presente questo fatto la forma tipica del sacc. gutt. non è quella ovoidea molto allungata che si trova nelle feci; ma quella nettamente ovoidea che si ottiene nelle culture sull'agar dalla gemmazione delle cellule ovoidee allungate delle feci.

[2] Tenendo presente questo carattere si può stabilire già un primo dato differenziale tra Blastomiceti e Oidii: questi ultimi se dànno luogo a forme filamentose, sono sempre rappresentati da veri ifi, ossia da tubi settati; nei primi invece le forme così dette ifiche sono delle vere e proprie catene di cellule più o meno allungate.

Ora vi sono blastomiceti che nel velo formato in sustrati liquidi [1] realmente dànno luogo a queste forme allungate; ve ne sono invece altri che non modificano gran fatto la loro forma, costituendo così un carattere differenziale di un certo valore.

C. Considerazioni sui caratteri culturali dei blastomiceti.

1. *Considerazioni sui caratteri rilevati dalle culture su terreni solidi.*

a) Culture in piastre di gelatina. — In massima le colonie di blastomiceti diversi sviluppatesi in gelatina, sia alcalina sia acida, sono fra di loro poco differenti: però a furia di paragoni, si riesce a fare quel che fece il Sanfelice, cioè a potere riunire in diversi gruppi le varie forme blastomicetiche, specialmente tenendo presenti i caratteri messi in rilievo dal Cuboni e Pizzigoni relativi al contorno delle colonie stesse. Non è però possibile, avendo varie forme che presentano il medesimo modo di sviluppo delle colonie, differenziarle fra di loro, o almeno i dati differenziali sono così incerti che non è possibile seriamente fondarsi su di essi.

Nello studio delle colonie blastomicetiche, a ogni modo, va tenuto conto del modo di presentarsi sia delle colonie superficiali come delle colonie profonde e le une e le altre vanno descritte seguendo sempre lo stesso indirizzo per potere istituire paragoni. A tale uopo io distinguo le colonie blastomicetiche:

a) a seconda della loro grandezza [2] *in:*
- — colonie grandi più di una capocchia di spillo;
- — colonie grandi quanto una capocchia di spillo;
- — colonie più piccole di una capocchia di spillo.

b) a seconda della loro forma in:
- — colonie rotonde;
- — colonie rotondeggianti;
- — colonie di forma irregolare.

c) a seconda dei caratteri della loro superficie in:

---

[1] Il Peglion giustamente però fa osservare che nei veli le cellule di lievito pastoriano si caratterizzano più facilmente che nelle colture ordinarie per la prevalenza in modo assoluto delle cellule allungate *a boudin*, le quali sono più piccole e più allungate delle cellule consimili che meno di frequente si rinvengono nei veli di lievito elittico.

[2] Questa ricerca va fatta almeno dopo una settimana di sviluppo nelle piastre per trarre dati costanti per ciascuna forma.

— colonie a superficie piana;

— colonie a supercie curva, o colonie sollevate a cupola;

— colonie sollevate nel centro e pianeggianti alla superficie o colonie mammellonate.

d) *a seconda dei caratteri dei bordi in:*

— colonie a bordi regolari, lisci (Fig. 9a, 10ª, 13ª);

— colonie a bordi lobati con le varietà lobato-sinuose (Fig. 16ª), lobato-cinnose (Fig. 17ª), lobato-areolate, lobato-ramose;

— colonie a bordi areolati (Fig. 14ª e 15ª) con la varietà areolato-ramose;

— colonie a bordi ramoso-raggiati. (Fig. 18ª).

Naturalmente poi in ciascuna colonia presentante i bordi con questi caratteri tipici si possono notare altri caratteri secondari; ma io sono d'avviso non convenga insisterci sopra perchè son talmente frequenti le modificazioni degli aspetti delle colonie della stessa forma blastomicetica, da non potere assolutamente contare su differenze di lieve conto. Del resto, come giustamente fa osservare il Peglion, anche i caratteri peculiari dei bordi possono vedersi variare nella stessa forma, tanto che una data forma che aveva contorno liscio lo presenta un bel momento intaccato. Ed è per questo fatto che si deve scegliere sempre lo stesso terreno culturale e ripetere le semine, poichè soltanto così i caratteri del contorno sino a un certo punto si ripetono e si può alla fine con sicurezza rilevare quali siano in realtà per ogni forma [1].

b) *Culture in gelatina per infissione.* — Dalle culture per infissione in gelatina, più che da quelle su piastre, si può stabilire anzitutto se i

---

[1] Per differenziare i lieviti oltre allo studio delle colonie provenienti da una sola cellula, si è ora introdotto il metodo Lindner, cioè lo studio delle cosiddette colonie giganti Secondo il Peglion queste che sarebbero caratteristiche del sacc. elipsoideus I, del pastorianus, del farinosus, dell'anomalus, ecc., tuttavia in fondo nella maggioranza dei casi darebbero risultati incostanti.

Io non ho insistito molto sullo studio di queste colonie perchè non sono di maneggio molto facile e perchè i termini di confronto fra di loro non è facile trovarli. Per quel che mi consta sono del resto pienamente d'accordo col Peglion e, per conto mio, non vedo ragione di preferirle alle colonie ordinarie Soltanto non è svantaggioso che coloro che si accingono allo studio dei blastomiceti per non incorrere a fare erronee descrizioni conoscano anche le colonie giganti delle forme che studiano, perchè esse possono ottenersi sulle lastre molto comunemente quando il materiale seminato non è stato prima bene sbattuto nei relativi tubi. In tali casi occorre distinguerle dalle colonie provenienti da una sola cellula e non ritenerle colonie superficiali, siccome in qualche descrizione mi è occorso di leggere.

blastomiceti fondano o no la gelatina, benchè, come diremo in seguito, una netta divisione tra blastomiceti fondenti e non fondenti non sia sempre possibile farsi.

I blastomiceti fondenti fluidificano la gelatina a imbuto (Fig. 24ª) o a cilindro (Fig. 25ª), lasciando generalmente galleggiante sulla superficie del substrato nutritivo una patina coi caratteri delle patine dei non fondenti.

I blastomiceti non fondenti, alla loro volta si sviluppano sulla superficie del terreno nutritivo, formando una patina che può mostrarsi:

di forma rotonda, rotondeggiante o irregolare, come le stesse colonie in gelatina a piatto;

limitata al punto d'innesto o poco estesa attorno al medesimo, o coprirlo tutto quanto;

pianeggiante o rilevata a capocchia di chiodo, ovvero rilevata nel centro soltanto e come spesso presentasi, con una escavazione a cratere;

a bordi lisci, regolari, o lobati, o areolati, o ramosoraggiati come le colonie in gelatina a piatto.

II. Lungo l'infissione:

come un cordoncino o nastrino biancastro più o meno granuloso, senza altri caratteri (Fig. 19ª);

come un cordoncino simile al precedente dal quale qua e là poi emanano delle gittate, generalmente corte e grosse (Fig. 20);

come un cordoncino simile al precedente dal quale emanano delle fine barbe, generalmente numerose e stipate e più lunghe nella parte alta dell'infissione in modo da dare all'infissione l'aspetto di un abete rovesciato (Fig. 22ª e 23ª) ma altre volte emananti senz'ordine o alternate qua e là dalla linea d'innesto come ciuffetti di peli elegantissimi (Fig. 21ª).

c) *Culture su agar-agar per strisciamento.* — Lo studio delle patine formantisi sull'agar-agar solidificato a becco di flauto, generalmente non fa rilevare caratteri speciali ai varii blastomiceti. Però, inteso a indicare uno dei dati per collocare in determinati gruppi i blastomiceti, deve essere preso in esame [1].

---

[1] È molto interessante conoscere i caratteri fondamentali della patine blastomicetiche sull'agar-agar per distinguerle da quelle degli oidii.

La patina blastomicetica, sia essa secca o umida, omogenea o mammellonata, distinguesi costantemente da quella oidica, secca, vellutata o con ripiegature, la quale non si puó distaccare che a brandelli e con difficoltà dal substrato culturale, mentre quella blastomicetica, facilmente si asporta toccandola semplicemente con l'ansa di platino.

Come ho già detto per la descrizione di questa patina io credo sia necessario fare innesti così su terreni alcalini come su terreni acidi, perchè vi sono blastomiceti che si sviluppano diversamente a seconda della reazione del substrato nutritivo.

Ciò premesso, si possono distinguere patine blastomicetiche:

secche sviluppatesi in terreni sia acidi che alcalini;

umide sviluppatesi in terreni sia acidi che alcalini;

secche sviluppatesi su terreni acidi, umide sviluppatesi su terreni alcalini; [1]

a superficie liscia;

a superficie mammellonata;

a superficie increspata;

a superficie polverulenta, farinosa;

limitato alla linea di innesto o poco diffuse dalla stessa;

diffuse su sutta la superficie del terreno nutritivo sia che questo sia di reazione acida che alcalina;

diffuse su tutta la superficie del terreno nutritivo se di reazione acida, poco diffuse dalla linea di innesto se di reazione alcalina;

a bordi lisci lobati o areolati o ramoso-raggiati;

spesse, sottili ecc.

d) Culture su patate. — È certamente importante l'innesto dei blastomiceti su patate perchè su queste può comparire il pigmento. Però dal punto di vista dei caratteri morfologici che possono rilevarsi dalla patina sviluppatasi, non si nota niente di diverso da quello che si è detto per la patina sviluppatasi su agar agar. [2] Generalmente la patina su

---

La patina blastomicetica è ancora, salvo qualche lieve eccezione, emulsionabile in liquidi, mentre invece quella oidica non lo è affatto o con molto stento.

Queste differenze fondamentali, dovrebbero tenersi presenti da coloro che restano indecisi nello stabilire se una data forma si diporti come un blastomiceta o come un oidio. Se tali conoscenze fossero divulgate, non si sentirebbe ancora nei trattati parlare di *mycodema albicans* (!) e di *saccaromyces albicans* (!) nè si rileggerebbero in lavori speciali le eterne e cosidette *caratteristiche descrizioni* del mughetto sviluppatisi sull'agar, descrizioni che non sono caratteristiche del mughetto ma di tutto il gruppo degli oidii.

[1] Il fatto inverso, non avendolo mai osservato, non credo opportuno di notarlo.

[2] Anche lo sviluppo delle patine blastomicetiche su patate è assolutamente diverso da quello delle patine oidiche. Queste ultime sono sempre asciutte, per lo più vellutate sulla superficie, quasi costantemente ai bordi, difficilmente distaccabili, o distaccabili a brandelli ecc., mentre quelle blastomicetiche presentano i caratteri già accennati e dippiù sono facilmente distaccabili ecc.

patate è una patina secca, raramente è umida, spesso è mammellonata, risultando dall'unione di tante colonie più o meno cupoliformi.

Noi la distingueremo in patina:

umida, secca, polverulenta, liscia, mammellonata, ecc. limitata diffusa, a bordi lisci, lobati, areolati, o ramosoraggiati, spessa e sottile, ecc.

e) *Culture in sustrati liquidi.* — I blastomiceti si sviluppano nei terreni liquidi senza intorbidare il substrato, formando un deposito al fondo e spesso anche sviluppandosi in superficie ove formano il così detto *Velo.*

È interessante studiare la formazione di quest' ultimo nei liquidi zuccherati, poichè è noto che non solo alcuni blastomiceti non lo formano, ma tra quelli che lo formano alcuni lo formano più presto e altri più tardi, rimanendo costante la temperatura.

Io ho potuto in realtà confermare che stabilita la temperatura più favorevole alla formazione del velo tra 25°—30°, vi sono blastomiceti che lo formano in poche ore e altri che lo formano in varii giorni e così via.

Però anche per la ricerca della temperatura di formazione del velo debbo insistere sul fatto che bisogna sperimentare con blastomiceti che si siano educati a vivere culturalmente, perchè può succedere che un blastomicete appena isolato formi un velo più tardi che dopo vario tempo che sia coltivato. Dippiù occorre usare terreni i più adatti allo sviluppo del velo, e questi sono i terreni zuccherati artificialmente e con aggiunta di mannite, sempre nelle stesse proporzioni.

In quanto al velo esso può presentarsi:

incompleto, quando è rappresentato da un cercine sviluppatosi tutt'attorno al recipiente nel punto di contatto del liquido con le pareti del recipiente.

completo quando copre tutta la superficie del liquido, rimontando o no le pareti del vaso; e in tal caso esso può essere: 1. liscio, continuo, e generalmente sottile; 2. polverulento e più o meno ripiegato.

Il primo velo secondo le ricerche del Peglion sarebbe per esempio tipico nel *sacc. anomalus;* il secondo nel *sacc. farinosus.*

D. — Considerazioni sui caratteri riproduttivi dei blastomiceti.

È noto che due sono i modi di riproduzione delle cellule blastomicetiche: quello per gemmazione e quello per ascospore.

1. *Riproduzione per gemmazione.* — Per osservare il modo di gemmare delle cellule blastomicetiche è necessario fare preparati a goccia pendente: io uso all'uopo brodo glucosato con aggiunta di un po' di gela-

tina (5 %) perchè i blastomiceti non cadano al fondo delle goccie) e osservo alla temperatura di 25°-30°.

Fatto così uno studio comparativo delle singole forme blastomicetiche, si possono distinguere appunto diversi modi di gemmare i quali sono propri di determinate forme o meglio di determinati gruppi di forme blastomicetiche, cioè:

a) Gemmazione dai poli delle cellule (raramente dal corpo cellulare) seguita dallo ingrandimento delle gemme sino a divenire grandi quanto la cellula madre, e successiva gemmazione di queste cellule figlie senza distaccarsi dalla cellula madre. Questo modo di gemmare dà luogo alle seguenti varietà di colonie:

α) colonie costituite da cellule addossate le une alle altre senza ordine speciale. Ciò avviene quando la gemmazione è tumultuosa ed è specialmente osservabile nei saccaromiceti ovoidali;

β) colonie costituite da cellule disposte a catena, l'una presso l'altra, con diramazioni per nuove formazioni cellulari, lateralmente al filare fondamentale, nei punti di contatto di cellula con cellula. Ciò avviene quando la gemmazione non è tumultuosa. Avviene raramente nelle cellule elittiche, costantemente nelle cellule tubulari (Fig. 8ª).

b) Gemmazione da qualunque punto del corpo cellulare e distacco delle cellule figlie prima che assumano le dimensioni delle cellule madri.

Da questo modo di gemmazione non possono originare vere e proprie colonie ma tutt'al più aggruppamenti cellulari di elementi giustapposti gli uni agli altri. Generalmente gemmano così alcuni sacc. ovali, e sferici.

2. *Riproduzione per ascospore.* — Molti blastomiceti, posti dopo vita rigogliosa in cattive condizioni di vita, si trasformano in vescicole ripiene di corpi generalmente rotondeggianti o più o meno allungati, dette spore, ciascuna delle quali, rompendosi l'involucro ascoforo, è capace di riprodurre la cellula madre.

La produzione di queste spore si può ottenere, seminando recenti culture di blastomiceti su blocchetti di gesso foggiati a cono tronco e posti in camere umide con un poco d'acqua distillata sterilizzata (Hansen) o su dischi di carote, di patate, ovvero su carta bibula sterilizzata e umida, ovvero, seminandoli in tubi contenenti acqua distillata e sterilizzata, ovvero in substrati culturali molto alcalinizzati, ovvero infine, e questo è il caso più raro, su tutti i substrati culturali.[1]

[1] Debbo far qui notare che un vero e proprio metodo, in tutti i casi conducente allo scopo desiderato per ottenere le spore, non lo possediamo. Nei casi che riescano negativi, occorre tentare tutte le vie possibili ricorrendo oltre ai sumentovati, ai metodi che si credono più acconci.

Parlando dei criteri analitici messi avanti dall'Hansen, ho già fatto rilevare l'importanza del rinvenimento delle spore di ciascun blastomiceta: insisto ora sulla necessità di ricercarle in ogni caso, e nel contempo di non spingersi a negarle allorchè esse non si trovano, essendo (come ho già detto) possibilissimo che il blastomicete per ragioni che sfuggono, non possa trovarsi in condizioni di formarle. Su questo riguardo voglio citare il fatto osservato intorno al Sacc. Guttulatus.

Secondo quanto aveva veduto il Buscalioni [1] il Sacc. Guttulatus, nelle feci stesse del coniglio, ove trovasi in tanta abbondanza, era capace di fare spore qualora le feci venissero raccolte, spappolate, lasciate essicare per 3-4 giorni, poi ribagnate, rilasciate essicare e così via per 8-10 giorni. Io ripetei le medesime osservazioni una prima volta e potei pienamente confermare le osservazioni del Buscalioni. Però quando insieme al Buscalioni [2] stesso ci accingemmo a ottenere le spore, ci fu impossibile per quanti tentativi con questo e con altri metodi, facessimo, tanto che finimmo col concludere che « a quanto pare oltre la umidità anche la temperatura dell'ambiente e altre cause non ben precisabili debbono esercitare una certa influenza nella produzione delle spore. » Coltivato poi il Sacc. Guttulatus non ci è mai stato possibile di farlo sporificare.

Quindi, in questo caso, senza le nostre due precedenti osservazioni, noi saremmo stati tratti a non ammettere la formazione ascofora nel Sacc. in discorso mentre esso la possiede.

Una volta intanto ottenuta la produzione delle spore, è interessante stabilirne il numero e la forma, perchè su di esso si basa la divisione dei generi dei blastomiceti. [3]

Il genere Monospora cui appartiene la Monospora caucasica (Metschnikoff) che forma spore filiformi (una per ogni asco) (Fig. 12ª d).

Il germe Nematospora (Peglion) cui appartiene la Nematospora Coryli che forma pure spore filiformi (otto spore ogni asco).

Il genere Saccharomices (Fig. 12 a, b, c) propriamente detto che forma spore rotonde od ovali in numero svariato da 2 ad 8 sinora — distinte in quattro tipi riguardo al loro modo di germogliamento, cioè:

1° un tipo che ha per esemplare il Sacc. cerevisiae I in cui le spore riempiono tutta la cellula madre e la trasformano in un corpo

---

[1] Malpighia, 1896.

[2] Questi Annali, questo volume.

[3] Cifr. JÖRGENSEN, loc. cit. - WILHELMI, *U. Sacc. Gutt.* Centr. f. Batit. II Abt. 1898.

alveolato, la cui parete poi crescendo la spora si rompe e queste rimangono libere, si accrescono e gemmano;

2° un tipo che ha per esemplare il Sacc. Ludvigii in cui le spore gemmano e si fondono insieme le gemme dando luogo a dei promiceli da cui si originano cellule blastomicetiche;

3° un tipo che ha per esemplare il Sacc. anomalus a spore semilunari con una parte prominente alla base, che rimane o scompare quando dalla superficie maggiore della spore si originano le gemme;

4° un tipo che ha per esemplare il Sacc. guttulatus in cui le spore crescono entro la cellula madre, lacerano la loro membrana e si trasformano in cellule blastomicetiche che fuoriescono con la rottura o il dissolvimento della membrana della cellula madre.

E. — Considerazioni sui caratteri biologici dei blastomiceti.

Per lo studio dei caratteri biologici, a scopo di diagnosi batteriologica, non è certamente possibile dilungarsi in ricerche che possono trovare adeguato posto solo in lavori speciali. Volendo anche dare a questo studio la stessa importanza di quello dei caratteri precedenti, fa quindi d'uopo, a mio avviso, limitarsi alla ricerca dei dati strettamente necessari e nel contempo più accessibili.

Possono quindi ricercarsi in ogni blastomicete le principali proprietà secretive, decompositive e i principali limiti di resistenza seguendo nello studio di questi dati una tecnica rigorosamente esatta, e dando una interpretazione ai risultati ottenuti seguendo sempre lo stesso indirizzo, come verrò dicendo qui appresso:

A. — *Studio delle proprietà secretive dei blastomiceti.* — I blastomiceti, come gli altri microrganismi, possono aver la proprietà di produrre del pigmento e degli enzimi.

a) *Sul pigmento dei blastomiceti.* - Il pigmento non è prodotto molto frequentemente dai Blastomiceti. Sono più infatti quelli che non ne formano che gli altri. A ogni modo si conosce un pigmento roseo, rossoframboesia, marrone, grigio-scuro, nero.

Il pigmento si forma generalmente molto bene nelle culture su patate: negli altri terreni meno bene invece: anzi alcuni blastomiceti che lo formano sulle patate, non lo formano poi affatto negli altri. Così di tre blastomiceti formanti sulle patate un pigmento grigioscuro, trovati dal Sanfelice, nessuno lo forma negli altri terreni, salvo uno che lo forma sul velo formatosi sulla superficie del succo di pomodoro.

Anche le patate però possono essere insufficienti, come io ho potuto

constatare per il *Sacc. ruber* (Demme)[1] e in questi casi, si possono fare tentativi in pappe di amido di riso glicerinato e in pappe di leguminose (fagiuoli, ceci, ecc.) glicerinate del pari: però sta il fatto che anche in questi, può succedere che il pigmento non si riformi più.

A ogni modo, è certo che il carattere della formazione del pigmento è sempre un carattere differenziale molto importante, tanto da permettere di potere distinguere i blastomiceti nei due gruppi di cromogeni e acromogeni.

b) *Sugli enzimi dei blastomiceti.*

α) *Sull'enzima proteolitico.*—Anche i blastomiceti che fluidificano la gelatina, sono assai meno numerosi di quelli che non la fluidificano. V'ha dippiù, che dei fluidificanti si può dire la maggior parte fluidifica la gelatina molto tardivamente (dopo dei mesi). Così il *Sacc. ruber* (Demme) la fluidifica dopo 8 mesi e secondo me dopo 2 mesi, così dei blastomiceti studiati dal Boullanger[2] uno la fluidifica dopo 2 mesi, due dopo 3, tre dopo 4, uno dopo 5 e uno dopo 6 mesi etc.

Questa tardiva azione dell'enzima proteolitico sulla gelatina, a mio avviso, potrebbe spiegarsi non per opera di un vero e proprio enzima secreto dalla cellula viva, ma per opera di una sostanza fluidificante la gelatina, capace di liberarsi dalle forme che vengono a morire.[3]

Ciò premesso, benchè, volendo stabilire se un blastomicete fluidifichi o no, si renda necessario di attendere molto tempo dopo lo innesto per infissione in gelatina (da 2 a 8 mesi almeno), io credo si possano distinguere i blastomiceti fluidificanti in due gruppi:

un gruppo di blastomiceti che fluidifica rapidamente (giorni o tutto al più qualche settimana;

un gruppo di blastomiceti che fluidificano tardivamente (dopo mesi).[4]

β) *Sull'enzima inversivo.* — Che alcuni blastomiceti posseggano la proprietà di trasformare il saccarosio in glucosio, è noto sino dai primi studi dell' Hansen, studi che sono stati ulteriormente ripresi e

---

[1] Questi Annali, vol. VII. 1897.

[2] Ann. Istit. Pasteur, 1896.

[3] Le ricerche sul proposito dovrebbero però più a lungo protrarsi per venire a una spiegazione chiara.

[4] Non è possibile fare distinzioni più minute perchè si incorrerebbe in errore. Cioè non è possibile stabilire dei sottogruppi di blastomiceti che fluidificano in 2 3-4, ecc, mesi Per esempio il *Sacc. ruber* che fluidificherebbe secondo Demme dopo 8 mesi e secondo me dopo 2 dove si potrebbe collocare?

completati da questo e da altri autori, estendendoli non solo al saccarosio ma anche ad altri zuccheri non invertiti.

Queste ultime ricerche non sempre sono facili e alla mano, e possono senz'altro rientrare nello studio delle proprietà decompositive; io quindi senza discorrerne più a lungo, dirò che credo sufficiente limitare le proprie ricerche al saccarosio, come quelle più accessibili e conducenti a risultati abbastanza rapidi.

Occorre però seguire una tecnica scrupolosa, tecnica che ho i miei dubbi che alcuni di coloro che si sono occupati dell'argomento, abbiano sempre seguita. Occorre infatti pensare che, dovendo innestare i blastoniceti in liquidi saccarosati sterili, con la sterilizzazione fatta mediante il calore, può succedere la trasformazione del saccarosio in glucosio. Questo inconveniente che si ripete spessissimo, lo si può evitare, filtrando il liquido alla candela dello Chamberland come io pratico costantemente: però non escludo che si possa anche usare la sterilizzazione al vapore fluente e 100° purchè si saggi replicatamente e in diversi controlli prima dell'innesto e prima di raccogliere i risultati finali, se il saccarosio si è o no invertito.

Una volta innestati i blastomiceti, occorre saggiare la presenza o no di zucchero invertito, non attendendo molto tempo ma a cominciare da due giorni in su, perchè vi sono blastomiceti che, una volta invertito il saccarosio in glucosio, decompongono poi questo in alcool e acqua.

Io preparo perciò una serie di tubi contenenti ognuno 10 cc. di brodo ordinario in cui sostituirsi al peptone un po' di estratto di Liebig e aggiungo il 2-4 per cento di saccarosio: innesto ciascun blastomicete in 12 tubi che pongo nel termostato a 30°. Dopo 48 ore saggio se nel primo tubo notasi la presenza del glucosio, dopo 3 giorni nel 2° tubo, dopo 4, nel 3°, ecc.

Intanto in base allo studio dell'enzima inversivo, è lecito potere distinguere i blastomiceti in due gruppi:

Blastomiceti che invertono e blastomiceti che non invertono. Questi ultimi possono ancora distingersi in blastomiceti che invertono rapidamente (in 2-4 giorni) o lentamente.

γ) *Sull'enzima diastatico.* — Vi sono blastomiceti che trasformino l'amido in zucchero? A questa domanda non si può dire sia stato sinora decisamente risposto. Il Fermi [1] che studiò sotto questo punto di vista diversi blastomiceti, dimostrò che essi non hanno azione sull'amido di patata. Lo studio di questa secrezione nei blastomiceti parrebbe

---

[1] Il Policlinico M. 1895.

quindi potesse omettersi se non nascesse il dubbio che qualche forma potesse averla.

Io quindi insisto nel ricercare se i blastomiceti innestati in pappe d'amido prive di glucosio diano luogo alla formazione del medesimo. A tal uopo, bisogna però togliere tutte quelle cause di errore, in cui sono di avviso siano incorsi quegli osservatori che innestando pappe di amido di patata con blastomiceti, poterono venire alla conclusione che i medesimi saccarificavano l'amido.

Le cause di errore sono insite nel fatto che le patate, specialmente dopo le manipolazioni subite per sterilizzarle, dànno la reazione dello zucchero, tanto più poi se vennero spappolate nell'acqua.

Qualora fosse impossibile ottenere un substrato così fatto, che debitamente sterilizzato non desse la reazione dello zucchero, io consiglio servirsi della pappa di amido di riso glicerinata (2 per cento).

δ) *Sull'enzima coagulante.* — Dopo le ricerche di alcuni autori (Kayser, Duclaux, ecc.) risulta che alcune forme blastomicetiche sono capaci di fare coagulare il latte; e in generale la caseina non si precipita in blocco, ma a granuli.

I blastomiceti che hanno questa proprietà (la quale non sempre è dovuta a una enzima, ma alla produzione di acidi) sono però pochissimi, tant'è vero che per es. il Sanfelice [1] non ne trovò alcuno fra quelli isolati dai succhi dei frutti, e io non ne ho isolati che due, sopra un numero di forme che supera la quarantina.

Per osservare se i blastomiceti coagulano o no il latte, si prepara questo così come ordinariamente, ossia lo si screma, lo si divide in tubi, lo si sterilizza per mezz'ora tre giorni al vapore fluente a 100°. Ottenuta poi la precipitazione granulare o no della caseina, conviene sempre saggiare la razione del latte, perchè, nel caso sia acido, è da supporsi siasi per opera dei blastomiceti prodotto acido nel latte stesso, il quale determina di per sè la precipitazione della caseina. In base al modo di agire sul latte, si possono quindi distinguere i blastomiceti in due gruppi:

Un gruppo formato dai blastomiceti che non determinano alterazioni apprezzabili nel latte;

Un gruppo formato dai blastomiceti che determinano la precipitazione della caseina, suscettibili di dividersi in due sottogruppi, l'uno formato da quelli che non determinano modificazione nella reazione del latte, e l'altro da quelli che determinano la produzione di acido sul latte stesso.

---

[1] Loc. cit.

ε) *Sull'enzima emulsivo.* — È noto [1] che alcuni microrganismi hanno la medesima proprietà dell'emulsina, capace quindi di scomporre dell'amigdalina in acido cianidrico, aldeide benzoica, glucosio, ragione per cui le culture dànno odore di mandorle amare. Alcuni blastomiceti innestati in brodo amigdalinato dal Fermi [2] non hanno mostrato questa proprietà. Del pari, altri da me sperimentati nell'istesso modo.

Può quindi ritenersi in linea generale che manchi ai blastomiceti la proprietà di decomporre l'amigdalina: però la ricerca non va trascurata, potendovene essere qualcuno che lo possegga e venga così con questo carattere facilmente differenziato.

All'uopo si prepara brodo ordinario, che è meglio tutt'al più neutralizzare (non alcalinizzare) o lasciare acido, vi si aggiunge i 3 per cento di amigdalina, vi si innestano i blastomiceti e poi, si fiuta a varii lassi di tempo (8-10-15 giorni).

B. — Studio delle proprietà decompositive dei blastomiceti.

Lo studio delle proprietà decompositive dei blastomiceti, potrebbe essere oggetto di numerose ricerche e spesso interessantissime; ma è giuocoforza limitarlo sempre alle più accessibili, pratiche e strettamente necessarie a rilevare caratteri differenziali, altrimenti per fare la diagnosi di una data forma blastomicetica si dovrebbero addirittura intraprendere dei lavori speciali di chimica.

Io quindi credo sia sufficiente studiare il modo di agire dei blastomiceti sugli zuccheri invertiti e non invertiti, su diverse sostanze organiche per vedere se si produce dalle medesime acido ossalico, su l'alcool per vedere se dal medesimo si produce acido acetico, sul latte per vedere se dal medesimo si produce acido lattico, ecc. [3]

a) *Azione sugli zuccheri.* — Il Fischer e il Thierfelder trovarono che gli zuccheri che vengono specialmente decomposti dai blastomiceti sono i glucosi, il saccarosio e il maltosio e anche il lattosio (dal così detto lievito del lattosio), e poterono osservare che la cellula blastomicetica non può consumare che quegli zuccheri, la cui struttura molecolare non differisce molto da quella del glucosio.

Io quindi ritengo inutile saggiare se alcool venga a prodursi da

[1] Loc. cit.

[2] Loc cit.

[3] Del resto ove lo si creda opportuno, si potranno estendere ulteriormente le ricerche, facendo agire i blastomiceti sulle cellulose, le gomme e quelle sostanze che si crederanno o saranno del caso.

una lunga serie di zuccheri per l'azione dei blastomiceti, e credo sufficiente studiare l'azione dei medesimi sul glucosio, sul saccarosio, sul maltosio e sul lattosio.

All'uopo basta preparare fiaschi contenenti ognuno 500 cmc. di una soluzione zuccherina al 6 per cento con aggiunta di un po' di peptone (1 per cento), innestarla, e dopo 8 giorni saggiare se nel distillato evvi o no presenza di alcool mediante la nota reazione del iodoformio. [1]

Volendo essere anche più minuziosi, si può anche addirittura far la ricerca quantitativa dell'alcool, distillando le soluzioni e poi servendosi per il disaggio della bilancia di Westphall.

Però, in tal caso, debbo far rilevare che per lo stesso blastomicete debbono esser fatti saggi ripetuti, potendo sensibilmente variare la quantità dell'alcool che si produce. Questo fatto l'ho potuto constatare per es. riguardo al sacc. ruber, il quale produce una quantità di alcool dal glucosio via via minore, per es. se lo si toglie da substrati via via più alcalini.

Gli è perciò che la ricerca quantitativa dell'alcool diventa talmente lunga prima di poter dare una esatta risposta che, io non credo, sia da farsi che in casi speciali. [2]

Volendo ora seguire idee di ordine più generale e anche un indirizzo sistematico, si possono distinguere i blastomiceti in due gruppi:

I. Blastomiceti che fanno fermentare solo gli zuccheri invertiti.

II. Blastomiceti che fanno fermentare gli uni e gli altri, distinguibile questo in una serie di sottogruppi che sarebbero i seguenti:

α) Blastomiceti che fanno fermentare: glucosio - saccarosio - maltosio - lattosio.

β) Blastomiceti che fanno fermentare: glucosio - saccarosio - maltosio, ma non il lattosio.

δ) Blastomiceti che fanno fermentare: glucosio - saccarosio, ma non il maltosio e il lattosio.

γ) Blastomiceti che fanno fermentare: glucosio - saccarosio - lattosio, ma non il maltosio.

È inutile istituire un gruppo δ ed un gruppo ε che facciano fermentare maltosio e lattosio o uno solo di questi due zuccheri e non

---

1 Nella preparazione delle soluzioni degli zuccheri non invertiti si abbia cura che colla sterilizzazione non vengano invertiti. Io filtro il liquido allo Chamberland, e così evito l'azione del calore.

2 Ne segue come tutti gli osservatori che da una o poche esperienze hanno dedotto la quantità di alcool che un blastomicete ha prodotto da zuccheri, sono certamente caduti in errore.

il saccarosio, perchè i blastomiceti che fanno fermentare o l'uno o l'altro dei primi due, fanno sempre fermentare il saccarosio. A ogni modo, volendo esser minuziosi potrà anche tenersi presente questa particolarità.

b) Azione su diverse sostanze e produzione di acido ossalico. — Lo Zopf[1] notò nel *Sacc. Hansenii* la proprietà di produrre ossalato di calce, qualora questo venisse coltivato in soluzione di mannite, dulcite, glicerina, lattosio, ecc. Questa caratteristica di un saccaromyces è certamente molto importante per la sua diagnosi: possono quindi, seguendo le orme dello Zopf, innestarsi i blastomiceti in soluzioni fatte colle medesime sostanze e ricercare l'acido ossalico. Occorre però attendere vario tempo (mesi) dopo lo innesto, prima di fare la ricerca, e servirsi di masse di liquidi relativamente grandi (500 ccc.).

c) Azione sull'alcool e produzione di acido acetico. — Dopo che furono rinvenuti blastomiceti capaci di indurre la fermentazione acetica dall'alcool, si rende necessaria anche questa ricerca. Il Sanfelice all'uopo innestava i blastomiceti in vino bianco sterilizzato, e poi saggiava dopo un certo tempo se era aumentato il grado di acidità. Io ho potuto isolare uno di tali blastomiceti da un vino inacidito esposto da vari mesi al diretto contatto dell'aria, e ho potuto col medesimo ottenere acido acetico dal vino bianco sterilizzato a grado alcoolico molto basso, nonchè nelle vecchie culture (2 mesi) in fiaschi di liquidi glucosati. Per questo genere di ricerche, devonsi quindi, a mio avviso, tenere presenti questi due fatti, cioè usare come terreni culturali. vini con grado alcoolico basso, ovvero soluzioni zuccherine, attendendo però molto tempo prima di dare il responso.

d) Azione sul latte e produzione di acido lattico. — La ricerca dell'acido lattico va fatta quando il latte è coagulato e la reazione si mostri acida. All'uopo si raccoglie il siero, lo si distilla e il residuo, privo di alcool, della distillazione si tratta con cromato di potassa e acido solforico: si ridistilla e nel distillato si cerca l'aldeide acetica, la quale, in questo caso, proviene esclusivamente dalla decomposizione dell'acido lattico.

C. — Studio dei limiti di resistenza dei blastomiceti.

Gli autori che si sono occupati seriamente e metodicamente di queste ricerche, per quanto si riferisce ai blastomiceti, sono pochissimi (Cadeddu, Fermi e Pomponi). È anche da notarsi che per ben precisare i limiti di resistenza dei blastomiceti occorre tempo molto lungo e

---

[1] Bot. Zeitung, 1889.

tecnica rigorosamente identica in tutti i casi, e dopo tutto i risultati non sono di una grande importanza diagnostica.

Non occupandoci dei limiti di resistenza dei blastomiceti agli agenti chimici, la quale ricerca dal punto di vista diagnostico ha quasi nessun valore per differenziare una forma dall'altra [1] e limitandoci a studiare i limiti di resistenza agli agenti fisici, si può, avuto riguardo a ciascun agente, calore, luce, ecc., stabilire dei gruppi di forme aventi una resistenza massima, una minima ed una media. Ciò risulterà da quanto segue:

a) *Limiti di temperatura.* — Risulta da una serie di esperienze, tenendo i blastomiceti per un'ora a diverse temperature da 50° a 80° che alcuni resistano a 50°–55° ma non a 60°, altri che resistono a 60°-65° ma non a 70° e altri a 70°–75° ma non a 80°. Può quindi stabilirsi che la resistenza minima a 50°-55°, la media a 60°–65°, la massima a 70°-75° per un'ora. [2]

È interessante, se si vuole che la tecnica conduca a risultati costanti, sottomettere all'azione della temperatura sempre la stessa quantità di materiale (per es. 5 goccie di emulsione di una patina sviluppatasi su agar in 5 cc. di acqua distillata o uguali quantità di cultura in brodo) perchè più materiale si usa in blocco, più il limite di resistenza si allontana dal vero, come è naturale.

Risultati assolutamente costanti danno i fili di seta impregnati di materiale blastomicetico sottoposti all'azione del calore, come del pari lo danno le pezzette di tela medesimamente preparate: però già tra i primi e le seconde si nota un po' di diversità nei risultati, dacchè

---

[1] Non altrettanto però deve dirsi come dato differenziale fra il gruppo dei Blastomiceti e quello delle altre forme di microrganismi. Il Fermi (Questi Annali, vol. VII - 1897) a questo proposito in un lavoro sulla resistenza dei microrganismi ai vari agenti chimici, ha osservato che i blastomiceti insieme agli ifomiceti sono i microrganismi che più resistono agli acidi, ma non alla potassa, verso cui sarebbero più resistenti gli schizomiceti insieme agli ifomiceti.

Fra i blastomiceti da lui studiati (7 forme) un sacc. elissoideo sarebbe stato il più resistente agli acidi e il meno resistente alla potassa. Dal suo studio risulterebbe ancora che l'HCl sarebbe la sostanza più adatta per differenziare i blastomiceti fra di loro

[2] Non è possibile stabilire i limiti assoluti di resistenza alla temperatura, perchè i blastomiceti che presentano una certa resistenza a una data temperatura, possono in seguito presentarne un altra, generalmente inferiore. Citerò il lievito di Neunkirchen e Bass che Kayser trovò resistere a 60°, e che quando dopo m lto tempo fu ripreso a esser studiato dal Boullanger non resisteva più che a 55°.

essendo maggiore il materiale nelle pezzette, più difficilmente a parità di condizioni vi agisce il calore che sui fili.

b) Limiti di resistenza alla luce solare. — Le ricerche su cui è lecito potersi sul proposito fondare sono quelle del Cadeddu [1], le quali conducono ai medesimi risultati delle mie, avendo seguito la stessa tecnica a bella posta, essendo d'altronde la più acconcia.

All' uopo si versano alcune gocce di emulsione di blastomiceti in acqua sopra vetrini coprioggetti sterilizzati, e si pongono, ognuno separatamente, entro provette sterilizzate che si immergono nell'acqua corrente e si espongono ai raggi del sole [2]. Occorre fare un gran numero di questi vetrini perchè dopo un paio di ore di esposizione bisogna cominciare a fare i saggi della vitalità o no dei blastomiceti, il che si pratica benissimo strisciando su agar glucosato e acido i vetrini stessi.

Intanto dal modo di diportarsi verso la luce solare si possono distinguere i blastomiceti in blastomiceti che resistono meno di 6 ore, in blastomiceti che resistono da 6 a 12 ore, in blastomiceti che resistono più di 12 ore.

c) Limiti di resistenza all' inanizione. — Quantunque lo studio del modo di diportarsi dei blastomiceti all'inanizione sembri essere importante, tuttavia io non credo possa servire come mezzo diagnostico, perchè i risultati variano troppo.

Avendo praticato innesti in acqua distillata sterilizzata di blastomiceti, avendo cura, di innestare sempre la stessa quantità pesata di materiale in 10 cc. di liquido, e in seguito dopo 1 giorno a 3 mesi fatti innesti dall'acqua distillata, su agar-agar glucosato, ho potuto convincermi che la durata di vita dei blastomiceti è variabile. Ve ne sono alcuni che possono persino sporificare e questi, si comprende, vivono per mesi e mesi; ve ne sono altri che se vengono innestati quando contengono molto glicogene, vivono più a lungo che quando non ne contengono.

In genere, del resto, avviene in queste condizioni che quelle forme che muoiono diventano alimento per le altre perchè, forniscono all'acqua distillata un materiale idoneo alla vitalità delle cellule superstiti. È così

[1] Rif. med. Napoli 1896.

[2] È molto interessante eliminare l' azione dei raggi calorifici (il che si evita coll'immersione nell'acqua corrente) per ottenere risultati costanti, come ancora non è indifferente esporre al sole, invece che vetrini preparati come sopra, delle culture in brodo. o delle patine emulsionate in acqua e parte entro tubi. Indubbiamente la tecnica sopra indicata dà i risultati più costanti.

che si spiega, come alcuni abbiano potuto affermare che i blastomiceti si sviluppano nell'acqua distillata! (Jona) [1].

d) Limiti di resistenza alla reazione del substrato. — È generalmente noto che i blastomiceti si sviluppano meglio in un terreno acido che in un terreno alcalino, ed infatti risulta dalle mie esperienze che tutti i blastomiceti da me posseduti si abituano meglio a vivere nei terreni sempre più acidi che in quelli sempre più alcalini.

Le mie ricerche sono state fatte aggiungendo a determinata quantità di agar neutro (5 cc.) decimi di cc. della soluzione di carbonato sodico al 25 % ovvero di acido tartarico al 50 %. Da esse però non potrei trarne precisi dati diagnostici interessanti specialmente per lo sviluppo in terreni acidi perchè, le stesse forme con passaggi ripetuti possono abituarsi a vivere in terreni molto acidi mentre appena isolati non si sviluppavano più quando il grado di acidità era ancora relativamente basso.

Quindi non credo che la ricerca dei limiti di resistenza del substrato possa servire di mezzo diagnostico di qualche valore, così come non lo può essere quella dell'inanizione.

II. — Indirizzo da seguirsi per giungere a differenziare una forma blastomicetica dall'altra.

Da tutto il sin qui esposto, è dunque lecito trarre fuori il metodo che sino ad oggi può ritenersi il più esatto e completo per differenziare le singole forme blastomicetiche.

Questo metodo essenzialmente consiste nel collocare ciascun blastomiceta che si studia in altrettanti gruppi, corrispondenti a ciascun suo carattere morfologico e biologico, e nel metterlo poi a confronto con altri medesimamente studiati in modo da trarne senz' altro e i dati differenziali e quelli che possono servire per la identificazione.

Se tutti i blastomiceti si fossero studiati secondo questo o simile metodo, si potrebbero istituire comparazioni che potrebbero presto condurre a risultati: però ciò non è stato fatto, e quindi bene spesso le varie forme che si isolano, debbono considerarsi come forme nuove.

---

[1] Rivista di sc. med., anno XIII.

Aggruppamento in base alla forma delle cellule.

CELLULE a forma sferica	CELLULE A FORMA OVOIDALE		CELLULA a forma di limone	CELLULE a forma di pera	CELLULE a boudin
	Ovoidea	Elissoidea			

Aggruppamento in base ai caratteri delle colonie su piastre.

(Colonie superficiali e colonie profonde).

IN BASE alla grandezza			IN BASE alla forma			IN BASE AI CARATTERI della superficie			IN BASE AI CARATTERI DEI BORDI																	
									rilevate da colonie su terreni calcalini									rilevate da terreni acidi glucosati								
										A bordi lobati									A bordi lobati							
Grandi quanto una capocchia di spillo	Più grandi di una capocchia di spillo	Più piccole di una capocchia di spillo	Rotonde	Rotondeggianti	Irregolari	A superficie piana	A superficie cupoliforme	A superficie mammellonata	A bordi lisci	Lobati	Lobato-sinuosi	Lobato-cinuosi	Lobato-areolati	Lobato-ramosi	Areolati	Areolati-ramosi	Ramoso-raggiati	A bordi lisci	Lobati	Lobato-sinuosi	Lobato-cinuosi	Lobato-areolati	Lobato-ramosi	Areolati	Areolati-ramosi	Ramoso-raggiati

Aggruppamento in base ai caratteri delle culture per infissione in gelatina.

FORME FLUIDIFICANTI				FORME NON FLUIDIFICANTI										
A fluidific. lenta		A fluidific. rapida		Sviluppo in superficie di una patina								Sviluppo lungo l'infissione		
Fluidificanti a imbuto	Fluidificanti a cilindro	Fluidificanti a imbuto	Fluidificanti a cilindro	limitata	diffusa	pianeggiante	A chiodo	mammellonata	A margini regolari	A margini lobati	A margini areolati	A margini ramosi	A cordoncino o a nastrino	A cordoncino con bottoni laterali	A cordoncino con produzione di barbe

Aggruppamento in base ai caratteri delle culture per strisciamento su agar.

PATINA secca in terreno acido e alcalino	PATINA secca in terreno acido, umida in terreno alcalino	PATINA umida in terreno acido e in terreno alcalino	PATINA a superficie liscia, omogenea	Patina a superficie mammellonata	Patina a superficie increspata	Patina a superficie polverosa, farinosa	Patina spessa	Patina sottile	PATINA A BORDI							
									Nelle culture in terreni alcalini				Nelle culture in terreni glucosati e acidi			
									lisci	lobati	areolati	ramosi	lisci	lobati	areolati	ramosi

Aggruppamento in base ai caratteri delle culture su patate.

PRODUZIONE di pigmento		FORMAZIONE DI PATINE													
Blastomiceti acromogeni	Blastomiceti cromogeni	secche	umide	A superficie liscia	A superficie mammellonata	A superficie increspata	A superficie polverosa, farinosa	limitate	diffuse	spesse	sottili	a bordi lisci	a bordi lobati	a bordi areolati	a bordi ramosi

Aggruppamento in base allo sviluppo in brodi zuccherati.

SVILUPPO IN SUPERFICIE																					SVILUPPO AL FONDO	
Mancanza di produzione del velo	Produzione di velo completo a 80°												Produzione di velo a cercine								Deposito	
	Dopo 12 ore	Dopo 1 giorno	Dopo 2 giorni	Dopo 3 giorni	Dopo 4 giorni	Dopo 5 giorni	Dopo 6 giorni	Dopo 7 giorni	Dopo 8 giorni	liscio	polverulento	con ripiegature	1 giorno	2 giorni	3 giorni	4 giorni	5 giorni	6 giorni	7 giorni	8 giorni	grumoso	polverulento

Aggruppamento in base al modo di gemmazione.

GEMMAZIONE DAI POLI DELLE CELLULE		GEMMAZIONE da qualunque punto della cellula
Formazione di colonie costituite da ammassi cellulari	Formazione di colonie ramificate	Formazione di colonie di cellule giustapposte

Aggruppamento in base alla sporificazione.

FORME in cui è stato difficile trovare le forme ascofore	FORME IN CUI LA SPORIFICAZIONE SI È OSSERVATA		
	Forme a spore rotonde	Forme a spore ovoidali	Forme a spore filiformi

Aggruppamento in base alla produzione o no di pigmento.

COLORITO del pigmento	BLASTOMICETI CHE FORMANO PIGMENTO su qualunque terreno				BLASTOMICETI CHE FORMANO PIGMENTO solo in alcuni terreni				BLASTOMICETI che non formano pigmento in qualunque terreno
	Patate	Agar	Gelatina	Liquidi	Patate	Amido di riso	Amido di leguminose	Terreni speciali diversi	

Aggruppamento in base alla secrezione di enzimi.

BLASTOM. CON ENZIMA proteolitico			BL. CON ENZIMA INVERSIVO (saccarosio in glucosio)			BL. CON ENZIMA diastatico		BL. CON ENZIMA COAGULANTE			BL. CON ENZIMA emulsivo (?)	
Forme che non lo posseggono	Forme che lo posseggono		Forme che non lo posseggono	Forme che lo posseggono		Forme che lo posseggono	Forme che non lo posseggono	Forme che non coagulano il latte	Forme che coagulano il latte		Forme che decompongono la amigdalina	Forme che non decompongono la amigdalina
	Rapida fluidificazione	Lenta fluidificazione		Inversione rapida	Inversione lenta				Per opera di un enzima p.d.	Per opera di un acido		

Aggruppamento in base all'azione sugli zuccari.

(Glucosio, saccarosio, maltosio, lattosio).

BLASTOMICETI CHE FERMENTANO ZUCCHERI INVERTITI E NON INVERTITI				BLASTOMICETI che fermentano solo gli invertiti
Blastomiceti che fermentano glucosio, saccarosio, maltosio ma non lattosio	Blastomiceti che fermenteno glucosio, saccarosio, ma non maltosio e lattosio	Blastomiceti che fermentano glucosio, saccarosio, lattosio ma non maltosio	Blastomiceti che fermentano glucosio, saccarosio, maltosio, lattosio	

Aggruppamento in base alla produzione di fermentazioni speciali.

Forme che producono acido ossalico in soluzioni di idrati di carbonio	Forme che producono acido lattico nel latte	Forme che producono acido acetico dall'alcool	Ecc., ecc., ecc.

Aggruppamento in base ai limiti di resistenza.

ALLA TEMPERATURA			ALLA LUCE SOLARE		ALL'ACIDITÀ del substrato	ALLA INANIZIONE	ALL'ALCALINITÀ del substrato
Blastomiceti che resistono per un'ora a 50°-55°	Blastomiceti che resistono per un'ora a 60°-65°	Blastomiceti che resistono per un'ora a 70°-75°	Blastomiceti che resistono meno di 6 ore	Blastomiceti che resistono 6-12 ore	Blastomiceti che resistono più di 12 ore		

Dato ora come ho detto un certo numero di forme blastomicetiche, alle quali, dopo il dovuto studio, siasi fatto trovare posto negli aggruppamenti citati, si possono, mettendo in confronto aggruppamento per aggruppamento, differenziare tra di loro o anche identificare.

Però, ciò non ostante, non sempre si troveranno caratteri tali da indurre costantemente a sicure identità o differenze, ed è per questo che, dopo una lunga serie di ricerche, io mi credo autorizzato a ritenere:

1. Che tenendo presenti i soli caratteri morfologici o i soli biologici non è possibile differenziare con sicurezza forma da forma o viceversa identificare forma con forma blastomicetica;

2. Che in massima è possibile identificare forma con forma blastomicetica quando esistono molti caratteri comuni morfologici e biologici, e viceversa differenziarla quando ne esistono molti diversi;

3. Che eccezionalmente è possibile distinguere forma da forma blastomicetica in base anche a un solo carattere biologico purchè sia molto importante; [1]

4. Che ancora eccezionalmente è possibile identificare forma con forma blastomicetica quando pur essendoci un carattere biologico importante che tenderebbe a differenziarle vi sono tutti gli altri morfologici e biologici che collimano. [2]

Cosicchè si può ritenere che pur essendo possibile in molti casi, mediante uno studio sistematico dei caratteri morfologici e biologici differenziare forma da forma blastomicetica, tuttavia in moltissimi altri ciò non si può ancora fare con certezza.

E tali conclusioni, che risultano da un lungo studio minuzioso, dovrebbero convincere una volta per sempre alcuni scopritori di blasto–

---

[1] Per es. si trovano dei blastomiceti che hanno il medesimo posto negli aggruppamenti riferentisi alle proprietà morfologiche e riproduttive, mentre poi ne differiscono per una biologica importantissima, produzione di acido lattico o di acido ossalico o fermentazione di alcool non invertiti, ecc.

I caratteri morfologici non avrebbero uguale valore. Così la forma cellulare che tanti autori prendono a base delle loro differenziazioni non ha nel più gran numero dei casi che poco valore e spesso nessuno. Tutti infatti parlano di avere veduto in questo o quel materiale forme simili al *cerevisiae*, o simili al *sacc. elissoideus*. senza pensare alla leggerezza di un tale asserto pronunziato senza alcuna garanzia se non quella fondata sullo aspetto della forma (!)

Così la forma delle colonie su piastre che ad alcuni scopritori di blastomiceti dai tumori pare sufficiente per stabilire differenze o identità tra una forma e l'altra (!) è un carattere da solo secondario, ecc.

Anche la produzione di pigmento che serve a identificare alcuni blastomiceti tra di loro, appunto perché pochissimi posseggono la proprietà di

miceti ad essere meno corrivi sia nel creare nomi e specie nuove sia nel giudicare identiche a forme note quelle che essi credono scoprire.

Si dovrebbe in vero oramai smettere dall'affermare continuamente che nelle urine, nelle feci, sulla pelle, nel latte, ecc., si sono trovati blastomiceti simili o identici o affini al cerevisiae, all'elissoideo, al guttulatus, ecc. senza darne le prove che lo dimostrino.

E del pari sarebbe da desiderare non fosse mai stato affermato che i blastomiceti che si rinvengono nei tumori sono quelli stessi che si trovano nell'aria; asserzione che critichiamo, non perchè non sia possibile, ma perchè fa davvero maraviglia sia stata lanciata, senza la più lontana prova dimostrativa: prima di lanciarla sarebbesi dovuto intraprendere lo isolamento e lo studio dei blastomiceti dell'aria, e identificarli con quelli dei tumori; il che sinora nessuno ha mai fatto.

SPIEGAZIONE DELLA TAVOLA

(TAV. IV)

Fig. 1ª Cellule blastomicetiche sferiche.
» 2ª Id. ovoidali ed elittiche.
» 3ª Id. a limone.
» 4ª Id. a pera.
» 5ª Id. a boudin.
» 6ª Formazione di cellule allungate da cellule rotonde in terreni liquidi.
» 7ª Formazione di cellule allungate da cellule ovoidali in terreni liquidi.
» 8ª Formazione di cellule ovoidali da cellule tubulari in terreni solidi.

---

produrne, non è un carattere sufficiente all'identificazione. Esiste per es. nell'aria comunissimo il *Rosahefe*, esiste pure benchè più raramente il *Ruberhefe*; ambedue danno un pigmento assai somigliante, e bene spesso, specialmente in principio indifferenziabile: eppure questi due blastomiceti sono diversi tra di loro, come risulta da ulteriori studi, ecc.

[2] Così per es. il *Sacc. Ruber* isolato dal Demme, mostrava non essere capace di produrre fermentazione alcoolica: e quello isolato da me, invece, non decomponeva il glucosio producendo alcool. Un carattere biologico di sì alta importanza, doveva bastare per differenziare l'uno dall'altro questi due blastomiceti, pure collimando tutti gli altri caratteri; però avendo io trovato che la quantità dell'alcool che il Sacc. Ruber produceva dal glucosio diminuiva a seconda che il saccaromiceta veniva coltivato in substrati sempre più alcalini, mi feci la convinzione che messo in condizioni speciali il mio *Sacc. Ruber* avrebbe perduto la proprietà di produrre la fermentazione alcoolica, e forse una delle condizione sarebbe stata quella di coltivarlo in terreni ancora più alcalini, dato che esso avesse potuto ancora svilupparvisi.

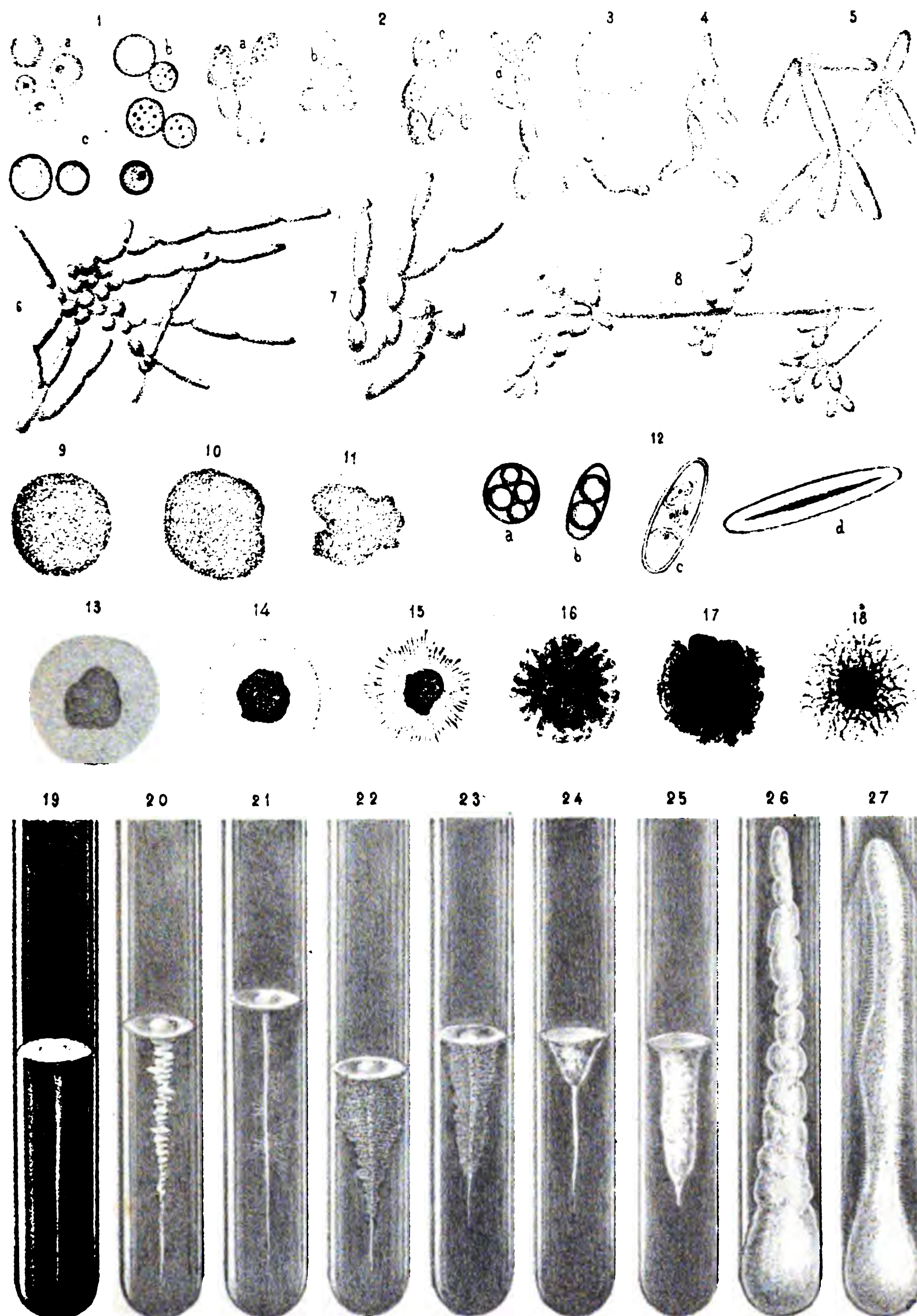

1
a
b
c
a
b
2
c
d
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
a
b
c
d
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27

Fig. 9ª Colonie rotonde.
» 10ª Colonie rotondeggianti.
» 11ª Colonie irregolari.
» 12ª Formazioni ascofore: *a* e *b* a spore rotonde: *c* a spore ovoidali; *d* a spore filiformi.
» 13ª Colonia mammellonata a bordi lisci.
» 14ª e 15ª Colonia mammellonata a bordi areolati.
» 16ª Colonia a bordi lobato-cinnosi.
» 17ª Colonia a bordi lobato-sinuosi.
» 18ª Colonia a bordi ramoso-raggiati.
» 19ª Cultura per infissione in gelat na a cordoncino.
» 20ª Id. id. con bottoni laterali.
» 21ª Id. in gelatina a cordoncino con ciuffetti laterali.
» 22ª e 23ª Cultura per infissione con barbe laterali lungo tutto il tratto infisso.
» 24ª Culture per infissione in gelatina: fluidificazione della gelatina a imbuto.
» 25ª Id. id.: fluidificazione della gelatina a cilindro.
» 26ª Cultura per strisciamento su agar a becco di flauto a bordi irregolamente lobati.
» 27ª Cultura a bordi areolati-ramosi.

Roma, marzo 1898.

Istituto di Farmacologia sperimentale della R. Università di Roma

IL GRADO DI ASSIMILABILITA' DEL PANE

RICERCHE

DEI

Dottori T. JACOANGELI e A. BONANNI

Il pane, nel nostro paese, divide colla polenta il primato tra gli alimenti di prima necessità, cosicchè il miglioramento della panificazione ha un interesse biologico, igienico e sociale.

La preparazione del pane, direttamente dal frumento, come la tecnica moderna ha reso possibile, ha risollevato il problema circa la preferenza da darsi al pane fatto con farina intera o completa od al pane bianco, esclusivamente manipolato con farine burattate in vario grado.

Sul finire del secolo passato (1778), Parmentier reclamava lo stacciamento al 20 °/₀ per fabbricare il pane dei soldati che, in allora, si faceva colla farina come proveniva dalla macinazione.

Il pane era nero, pesante, pastoso, disgustevole, dimodochè solo a gradi fu accettata quest' idea per la confezione del pane per l'esercito francese.

Infatti nel 1822 si cominciò a togliere il 10 $^{0}/_{0}$, poscia nel 1844 il 15 $^{0}/_{0}$ e infine, nel 1853, il 20 $^{0}/_{0}$ di crusca.

Da quell' epoca la questione del pane fu oggetto di studi sperimentali e di discussioni in vari congressi. Si determinarono due correnti, una favorevole al pane intero o completo, l'altra al pane più o meno sbarazzato dalla crusca. L'esperienza popolare ha ritenuto e ritiene che il pane fatto con farina non eccessivamente burattata contenente cioè

una parte di cruschello (pane casalino) sia il migliore per le proprietà nutrienti e per il gusto piacevole anche di fronte ai pani di lusso e di prima qualità.

La questione meritava di esser studiata e risolta tanto più che la crisi annonaria ha creato delle generali difficoltà per l'alimentazione popolare e dato stimolo all' industria per la produzione di pane a buon prezzo.

Seguendo quest' impulso, dopo lo studio sull'assimilazione e sul valore nutritivo delle paste maidiche, fatto da noi nello scorso anno, [1] abbiamo creduto opportuno di indagare il grado di assimilabilità delle varie qualità di pane più comunemente usate in Roma e nella provincia romana.

Presso di noi mancavano delle ricerche sull'argomento; cosicchè si era costretti a servirsi dei dati raccolti principalmente dai fisiologi tedeschi, onde farsi un' idea dell'assimilazioce dei pani variamente confezionati.

I dati così fornitici non sono del tutto riportabili alle condizioni del nostro paese. In vero, per il proletario italiano l'albumina nella forma più digeribile ed assimilabile di carne, latticini, ecc., è un cibo raro. Egli si nutre esclusivamente, o quasi esclusivamente, di vegetali. La bevanda più comune è l'acqua.

Secondo i dettami del Noorden, [2] Bunge, [3] ecc., volendo determinare il grado di assimilabilità di una determinata sostanza alimentare, e nel caso nostro del pane, necessita somministrarla nella forma e nella quantità più in uso nella pratica ordinaria.

Di più debbono venire adoperati il minimo possibile di condimenti, usuali per l' individuo fatto soggetto di ricerca. Necessita inoltre che l' individuo sia abituato al genere di vita da sperimentare.

A noi fu facile l'ottemperare a quest'ultima condizione, inquantochè il pane è un alimento quasi usuale del nostro popolo ed, in taluni periodi dell'anno, forma, per la grande maggioranza, l'esclusivo pasto quotidiano.

---

1 *L'alimentazione colle paste di granturco e miste.* -- Questi Annali, volume VII, 1897.

2 *Nozioni fondamentali per le ricerche sul ricambio organico.* Trad. Grasselli, Torino, 1897, p. 40.

3 *Trattato di chimica fisiologica e patologica, Trad. P. Albertoni.* — Milano 1897.

Il soggetto da noi scelto fu G. G, d'anni 49, robusto contadino da Civita Castellana. Misura 145 cm. in altezza: pesa kg. 54, al dinamometro di pressione segna kg. 46.

Durante il periodo dell'esperienze mantenne le ordinarie abitudini di vita di agricoltore. Occupava parte della giornata dissodando l'orto dell'Istituto fisiologico ed accudendo ad opere di giardinaggio.

Quantunque per carattere docile e scrupoloso nel mettere in pratica le nostre prescrizioni, non pertanto era da noi rigorosamente e regolarmente sorvegliato.

Le nostre ricerche furono intraprese nel novembre e dicembre 1897 e continuate nel gennaio e febbraio 1898. Compresero nove periodi, in ciascuno dei quali fu studiata una determinata qualità di pane.

Lo scopo precipuo delle nostre indagini fu il raffronto comparativo del grado di assimilazione dei pani casalini e di 3ª qualità, rispetto al pane bianco di 1ª e 2ª qualità e a quello intero o completo.

In Roma sono in commercio tre qualità di pane comune, una di lusso e due qualità, dette di 1ª e 2ª. Nei quartieri popolari si vende anche una qualità di pane, meno bianco, ma che non molto differisce dal pane casareccio, tanto comune nelle varie provincie d'Italia. Per quest'ultimo tipo abbiamo scelto il pane della regione romana e toscana.

A questi pani abbiamo aggiunto il pane militare della guarnigione di Roma che, come si sa, è dello stesso tipo del pane casalingo delle provincie.

Ciascuna serie d'indagini comprendeva un periodo preliminare o di prova. Esso durava quattro giorni nei quali l'individuo si nutriva colla stessa quantità e qualità di pane, come nel periodo d'osservazione o sperimentale propriamente detto. Questo comprendeva tre giorni durante i quali venivano sistematicamente fatte le ricerche. In tal modo si aveva la sicurezza di escludere l'influenza della dieta precedente e resa più facile ed esatta la demarcazione delle feci.

L'individuo si levava di buon mattino, defecava, e quindi si recava al lavoro. Verso le 10 preparava il primo pasto e mangiava. Dopo un piccolo riposo ritornava al lavoro campestre che proseguiva fin verso le 16, ora del secondo pasto. Si coricava verso le ore 19.

Il nostro soggetto di ricerca è un individuo veramente adatto per questo genere di studii, esso, molto bene si prestò allorchè facemmo le nostre indagini con le paste maidiche. Severo nelle sue abitudini, regolare nelle funzioni, con rara indifferenza sopporta le varie specie d'alimentazioni ed il genere di vita uniforme e sistematica.

Per determinare il quantitativo delle sostanze azotate, grasse e idrocarbonate che vengono assorbite durante un regime dietetico costante dai componenti dell'alimento ingerito, debbono venir sottratte quelle eliminate colle feci. In questo calcolo dovrebbe però esser tenuto conto anche della parte proveniente dai secreti del canale gastro-intestinale. Infatti, stando alle ri-

cerche del Rieder [1] con alimentazione anozotata, la quantità di azoto espulsa per l'intestino è circa l'8 °/₀ dell'uscita complessiva dell'azoto. Ma, come in proposito osserva il Noorden, [2] praticamente di ciò non si tien conto, bastando solo di porre le perdite dell'azoto, del grasso e dei carboidrati colle feci, di fronte a tutto l'azoto grasso e carboidrati introdotti.

In questo modo si ha il mezzo di determinare la percentuale della perdita della sostanza secca del cibo in toto e dei suoi componenti alimentari.

Per causa delle divergenze che esistono circa l'intensità dei processi putrefattivi enterici con un'alimentazione puramente vegetale in cui gli idrati di carbonio prevalgono sulle sostanze azotate, abbiamo determinato gli eteri solforici eliminati coll'orina. Si ha così l'indice sicuro di misurazione della putrefazione intestinale.

Di ciascuna qualità di pane che doveva servire per un dato periodo sperimentale si teneva conto anzitutto dei caratteri fisici e organolettici. Avanti che al nostro individuo fosse apprestata la razione, colle norme volute, se ne prendeva giornalmente un campione, e su di una quantità esattamente pesata si procedeva all'essiccazione onde calcolarne l'acqua. Sulla sostanza secca erano presi i saggi per la determinazione dell'azoto, dei grassi e delle ceneri. Per l'azoto usammo il metodo Kjeldahl-Argutinsky. [3]

La quantità della sostanza secca presa era di gr. 0,1-0,5. Mettendo a riscontro la quantità di sostanza secca presa e le quantità di azoto trovato, si aveva il rapporto per dedurne le percentuali per ogni saggio e da queste si deduceva una media. Allorchè i saggi sono ben presi, le singole determinazioni poco differiscono fra loro.

Per la determinazione del grasso usammo l'apparecchio di Soxhlet che facevamo funzionare per 24 ore. Impiegammo per questo dosaggio i tubetti di carta sgrassata, messi in commercio dalla casa Schleicher e Schull. Colla maggior parte degli sperimentatori considerammo, come corpi grassi, tutte le sostanze estraibili con etere anidro. Le ceneri venivano ottenute in un crogiolino di platino, fino a completo imbianchimento. Gli idrati di carbonio venivano calcolati per differenza.

Il soggetto delle nostre ricerche abitualmente defecava, con regolarità, una volta al giorno, nelle prime ore del mattino (circa le 7). Tale regolarità mantenne pure durante il periodo dell'esperienze.

Per ottenere la demarcazione delle feci appartenenti a un dato periodo

---

[1] *Bestimmung der Menge des in Kothe befindlichen nicht von der Nahrung herrührenden Stickstoffes* — Zeitschr. f. Biol. Bd. XX p. 378, 1884.

[2] *Lehrbuch der Pathologie des Stoffwechsels*, 1893.

[3] *Ueber die Kjeldahl -- Willfarth'sche Methode der Stickstoffbestimmung unter Berücksictung ihrer Anwendung zur Stoffwechselversuche* — Pflueger's Arch. f. d ges. Physiol. Bd. XLVI, p 581, 1890.

di ricerca vari sono stati i mezzi escogitati dagli sperimentatori. Rubner [1] nello studio dell'assimilazione dei pani provenienti da farine di varia qualità, usó dapprima il nero fumo, di poi in altre esperienze nero fumo e latte Ricorse a quest'ultima combinazione per ottenere oltre la diversa colorazione una diversa consistenza delle feci. Altri sperimentatori per delimitare le feci si servirono di legumi, dell'uva secca, ecc. Grützner [2] fa una critica a questi metodi di demarcazione delle feci, potendo, per effetto della peristalsi intestinale, le sostanze impiegate non progredire regolarmente nel tubo entrerico, ed, in certi casi, anche risalire in alto. Noi, del resto, riteniamo giusto quanto già notò Albertoni [3] che cioè questi mezzi sono superflui qualora gli individui abbiano una circolazione fecale normale e regolare. Questa regolarità spesso è perturbata dal rapido passaggio da una dieta mista ed una esclusiva di pane, ma, nel nostro individuo, ciò non si è mai avverato.

Nelle esperienze del Rubner [4], osservando le diarie, si vede chiaramente come talora il ciclo fecale, nel soggetto di ricerca, è alterato, massime durante l'uso del pane completo. Tale circostanza non è ultima fra le condizioni che determinano gli inconvenienti accennati dal Grützner per ciò che si riferisce alla poca esattezza dei mezzi usati nella demarcazione delle feci. Essi sono in grado di ben corrispondere solo nel caso che l'individuo di ricerca venga preparato alla dieta con un periodo preliminare di prova. Adoperando la miscela del Noorden (carbone vegetale in emulsione gommosa) abbiamo potuto verificare ciò in talune separate esperienze. Trovandoci nelle condizioni sopra accennate potemmo convincerci di esser nel vero considerando, come feci di una data giornata quelle emesse al mattino del giorno successivo dell'esperienza. Le feci delle 24 ore venivano direttamente raccolte in una grande capsula tarata di porcellana; cosí facendo era facile di conoscerne prontamente l'esatto peso. Avanti di prenderne il campione venivano con cura rimescolate a mezzo di una spatola, in modo da farne una poltiglia omogenea Su di una parte veniva determinata l'acqua e sulla sostanza secca. con i metodi stessi usati per l'analisi del pane, l'azoto, i grassi, le ceneri.

Coll'alimentazione esclusiva di pane, le feci non cambiarono notevolmente in contenuto d'acqua Sempre formate, ma d'aspetto alquanto variabile, secondo la qualità del pane somministrato. Più omogenee per il pane

---

[1] *Ueber den Werth der Weizenkleie für die Ernährung des Menschen.* Zeitschr. f. Biol. Bd. XIX, p. 45, 1883.

[2] *Zur Physiologie der Darmbewegung.* Deutsche Med. Wochenschr. 1894, Nr. 48, p. 897.

[3] *Sul bilancio nutritivo del contadino italiano.* R. Accademia delle Scienze dell'Istituto di Bologna, 26 Nov. 1893. - *Ricerche sul bilancio nutritivo di una famiglia borghese.* R. Accademia delle Scienze dell'Istituto di Bologna, 26 Apr. 1896.

[4] Loc. cit.

di prima e seconda qualità, meno per le qualità inferiori. Coll'uso del pane intero o completo le feci furono relativamente più molli e somiglianti a quelle degli erbivori (feci di bue). Già Rubner notò questo fatto. Il suo individuo, allorchè si nutriva col pane integrale, emetteva delle feci paragonabili al tritello ammassato e simili del tutto agli escrementi del cavallo. Disseccate si presentavano spugnose, soffici, leggerissime per la crusca che contenevano Pestandole in un mortaio per la presa dei campioni, avevamo la sensazione come s'avesse a che fare con detriti di paglia.

La quantità del pane consumato giornalmente venne approssimativamente calcolata dall'individuo stesso molto facilmente poichè, come già notammo non di rado, nella sua vita ordinaria si nutriva di solo pane. La cifra media di queste razioni, calcolate da lui ad occhio, risultò a noi del peso di gr. 624, cifra che durante l'esperienze amministrammo come razione giornaliera costante. Questa razione, come verificammo in alcune osservazioni di prova, era sufficiente e produceva la sazietà dell'individuo. Questi preferì di mangiare il pane nel seguente modo. Tagliato in fette, lo metteva in un'ampia scodella, vi gettava sopra dell'acqua calda salata, che vi lasciava a contatto per alcuni minuti. Indi scolava l'eccesso di essa e, sul pane, così preparato, aspergeva pochissima quantità di un condimento, a lui usuale, consistente in una specie di *soffritto* in cui entrava in quantità piccolissima olio, sale, conserva di pomodoro ed aglio. La quantità di questi ingredienti era sempre costante e di conosciuta composizione: olio gr. 30, conserva di pomodoro gr. 10. Come si vede la quantità di condimento non era per una razione di lusso, ma abituale alla vita dei nostri contadini.

Per bevanda usava dell'acqua a volontà e ad ogni pasto un decilitro di vino leggero.

Le proprietà fisiche del pane influiscono senza dubbio sul grado della sua digeribilità ed assimilabilità. Menicanti e Prausnitz [1] hanno messo in rilievo l'importanza che hanno sulla secrezione del succo intestinale e sulla formazione delle feci. Un pane soffice e spugnoso è più facilmente assorbito che un pane duro e pesante.

Nella rassegna dei pani usati crediamo opportuno dare un rapido cenno delle loro proprietà fisiche ed organolettiche, accanto alla loro composizione chimica.

Nella I serie d'esperienze studiammo il grado di assimilazione del comune pane bianco di prima qualità usato in Roma. Questo si presenta in forma di pagnotte del peso di circa 1 Kg. È bianco, poroso, di midolla leggera, soffice, con crosta ben cotta, gialla, sottile; di sapore ed odore gradevoli. La composizione chimica, nei giorni di esperienza, ha oscillato tra questi limiti:

---

[1] *Untersuchungen über das Verhalten verschiedener Brotarten im menschlichen Organismus.* Zeitschr. f. Biol, Bd. XXX, p. 328, 1893.

Umidità 28,04 — 29,52 %;
Nella sostanza secca:
Sostanze azotate 8,22 — 8,40 %;
Grassi 1,03 — 1,15 %;
Ceneri 0,98 — 1,06 %.

Nella II serie d'esperienza, il pane adoperato fu il comune pane di 2ª qualità, egualmente usato popolarmente in Roma.

Per i caratteri fisici di poco differisce da quello di 1ª qualità:
Umidità 29,45 — 30,20 %;
Nella sostanza secca:
Sostanze azotate 10,71 — 10,84 %;
Grassi 0,56 — 0,62 %;
Ceneri 0,98 — 1,03 %.

Il pane di 3ª qualità, venduto abitualmente sul mercato di Roma, e studiato nella III serie d'esperienze, si presenta sotto forma di pagnotte del peso di 1 Kg. circa. Ha crosta giallo-grigia, alquanto spessa, midolla meno soffice e porosa di colore più oscuro. Odore speciale gradevole, piacevole al gusto, di facile masticazione. Contiene:
Umidità 32,50 — 33,00 %;
Nella sostanza secca:
Sostanze azotate 11,78 — 11,86 %;
Grassi 0,44 — 0,56 %;
Ceneri 1,33 — 1,40 %.

Due furono i pani casalinghi da noi studiati, l'uno preparato da A. Valiani in Roma col sistema in uso nella provincia di Lucca, l'altro pervenutoci da Civita Castellana, provincia di Roma.

La forma è a pagnotte allungate (filoni) del peso di Kg. 1,5. Pane ben cotto, crosta giallo-scura, spessa; midolla bianco-grigia, soffice, abbastanza porosa; sapore gradevole speciale. Queste due qualità di pane chimicamente poco differiscono una dall'altra. Il primo ha:
Umidità 32,45 — 33,10 %;
Nella sostanza secca:
Sostanze azotate 11,80 — 11,89 %;
Grassi 0,44 — 0,54 %;
Ceneri 1,70 — 2,10 %.

Il secondo ha:
Umidità 32,48 — 33,15 %;
Nella sostanza secca:
Sostanze azotate 12,85 — 13,02 %;
Grassi 0,40 — 0,52 %;
Ceneri 0,92 — 1,10 %.

Dello stesso tipo è il pane militare o di munizione della guarnigione di Roma.

Umidità 37,25 — 38,10 %;
Nella sostanza secca:
Sostanze azotate 13,35 — 13,62 %;
Grassi 0,45 — 0,64 %;
Ceneri 1,29 — 1,44 %.

Il pane completo, detto integrale, da noi studiato è stato l'« Antispire » fabbricato in Roma con il metodo di Desgoffe-Avedyk. Esso si presenta in pani oblunghi di superficie scabra; crosta poco spessa; midolla grigio-scura, poco soffice, occhi piccoli; qua e là bricciole di corteccia e frammenti di grano. Pesante, sodo, di odore e sapore che ricorda il pane casareccio. Ruvido in bocca, viene masticato e deglutito con qualche difficoltà. Contiene:

Umidità 40 — 41,2 %;
Nella sostanza secca:
Sostanze azotate 13,80 — 13,87 %;
Grassi 1,01 — 1,04 %;
Ceneri 3,29 — 3,33 %.

A complemento del lavoro, nelle due ultime serie d'esperienze, abbiamo aggiunto i pani di 3ª qualità messi in vendità in Roma dalla *Società cooperativa degli impiegati* e dai *Forni e magazzini cooperativi.* Il loro aspetto fisico e le loro proprietà organolettiche, poco si discostano dal pane di 3ª qualità fabbricato nei vari forni di Roma e da quello casalino della provincia. Il primo ha:

Umidità 36.15 — 38.02 %;
Nella sostanza secca:
Sostanze azotate 12.98 — 13.23 %;
Grassi 0.42 — 0.50 %;
Ceneri 0.92 — 1.15 %.

Il secondo ha:

Umidità 33.13 — 34 %;
Nella sostanza secca:
Sostanze azotate 13.05 — 13.19 %;
Grassi 0.40 — 0.47 %;
Ceneri 0.95 — 1.21 %.

Esponiamo in forma di tabelle i risultati ottenuti nelle nostre esperienze:

TABELLA I. — **Pane bianco 1ª qualità. — Roma.**

DATA	RAZIONE					FECI				
	Sostanza secca	Sostanze azotate	Sostanze grasse	Sostanze idrocarbonate	Ceneri	Sostanza secca	Sostanze azotate	Sostanze grasse	Sostanze idrocarbonate	Ceneri
	gr.	gr.	gr.	gr.	gr.	gr.	gr.	gr.	gr.	gr.
3 dicembre 1897	496,03	44,72	35,17	400,79	15,35	20,83	7,64	4,50	5,87	2,82
4 Id.	494,72	45,41	35,47	398,86	14,98	26,71	8,31	4,24	11,32	2,84
5 Id.	493,59	44,83	34,92	398,69	15,15	18,75	7,39	4,39	4,22	2,75

TABELLA II. — **Pane bianco 2ª qualità. — Roma.**

DATA	RAZIONE					FECI				
	Sostanza secca	Sostanze azotate	Sostanze grasse	Sostanze idrocarbonate	Ceneri	Sostanza secca	Sostanze azotate	Sostanze grasse	Sostanze idrocarbonate	Ceneri
	gr.	gr.	gr.	gr.	gr.	gr.	gr.	gr.	gr.	gr.
10 dicemb. 1897	485,04	55,11	32,87	381,95	15,11	26,19	10,05	4,33	9,06	2,75
11 Id.	482,55	54,45	33,03	380,21	14,86	18,64	8,19	3,22	5,01	2,22
12 Id.	487,23	55,53	32,99	383,71	15,00	33,26	11,91	5,17	12,81	3,37

TABELLA III. — **Pane 3ª qualità. — Roma.**

DATA	RAZIONE					FECI				
	Sostanza secca	Sostanze azotate	Sostanze grasse	Sostanze idrocarbonate	Ceneri	Sostanza secca	Sostanze azotate	Sostanze grasse	Sostanze idrocarbonate	Ceneri
	gr.	gr.	gr.	gr.	gr.	gr.	gr.	gr.	gr.	gr.
17 dicemb 1897	468,20	57,76	32,30	361,73	16,41	38,39	11,72	4,26	19,27	3,14
18 Id.	465,08	57,02	32,68	359,22	16,16	34,88	12,03	4,37	15,19	3,29
19 Id.	466,32	57,33	32,17	360,35	16,47	43,83	11,35	4,53	24,98	2,97

TABELLA IV. — **Pane casalino. — Valiani.**

DATA	RAZIONE					FECI				
	Sostanza secca	Sostanze azotate	Sostanze grasse	Sostanze idrocarbonate	Ceneri	Sostanza secca	Sostanze azotate	Sostanze grasse	Sostanze idrocarbonate	Ceneri
	gr.	gr.	gr.	gr.	gr.	gr.	gr.	gr.	gr.	gr.
5 gennaio 1898	468,51	57,55	32,70	358,91	19,45	48,25	10,53	4,54	29,76	3,42
6 Id.	464,45	57,44	32,33	356,99	17,69	40,05	9,70	4,18	23,14	3,03
7 Id.	467,57	57,52	32,18	359,28	18,59	56,90	12,19	4,81	35,71	4,19

TABELLA V. — **Pane casalino. — Civita Castellana.**

DATA	RAZIONE					FECI				
	Sostanza secca	Sostanze azotate	Sostanze grasse	Sostanze idrocarbonate	Ceneri	Sostanza secca	Sostanze azotate	Sostanze grasse	Sostanze idrocarbonate	Ceneri
	gr.	gr.	gr.	gr.	gr.	gr.	gr.	gr	gr.	gr.
19 gennaio 1898	468,32	61,94	32,01	359,90	14,47	43,74	11,81	4,19	24,79	2,95
20 Id.	464,14	62,12	32,49	354,35	15,18	53,14	12,44	4,82	33,12	2,76
21 Id.	464,58	62,01	32,16	355,31	15,10	48,78	11,22	3,90	30,95	2,71

TABELLA VI. — **Pane militare. — Roma.**

DATA	RAZIONE					FECI				
	Sostanza secca	Sostanze azotate	Sostanze grasse	Sostanze idrocarbonate	Ceneri	Sostanza secca	Sostanze azotate	Sostanze grasse	Sostanze idrocarbonate	Ceneri
	gr.	gr.	gr.	gr.	gr.	gr.	gr.	gr.	gr.	gr.
12 gennaio 1898	433,35	59,37	32,41	325,66	15,81	47,65	13,13	4,68	26,82	3,02
13 Id.	438,56	60,51	32,83	330,57	14,65	36,95	10,16	3,78	20,61	2,40
14 Id.	424,45	59,21	32,02	317,19	16,03	55,11	14,71	5.39	31,39	3.62

TABELLA VII. — **Pane « Integrale ». — Roma.**

DATA	RAZIONE					FECI				
	Sostanza secca	Sostanze azotate	Sostanze grasse	Sostanze idrocarbonate	Ceneri	Sostanza secca	Sostanze azotate	Sostanze grasse	Sostanze idrocarbonate	Ceneri
	gr.	gr.	gr.	gr.	gr.	gr.	gr.	gr.	gr.	gr.
26 gennaio 1898	421,40	59,47	34,11	304,87	22,95	72,05	20,27	5,09	42,13	4,56
27 Id.	415,16	58,87	34,15	299,43	22,71	83,86	20,86	5,15	53,73	4,12
28 Id.	413,91	58,48	34,10	298,52	22,81	74,91	19,88	4,91	45,76	4,36

TABELLA VIII. — **Pane 3ª qualità « Cooperativa Impiegati ». — Roma.**

DATA	RAZIONE					FECI				
	Sostanza secca	Sostanze azotate	Sostanze grasse	Sostanze idrocarbonate	Ceneri	Sostanza secca	Sostanze azotate	Sostanze grasse	Sostanze idrocarbonate	Ceneri
	gr	gr.	gr.	gr.	gr.	gr.	gr.	gr.	gr.	gr.
2 febbraio 1898	445,42	60,00	32,00	339,16	14,26	48,99	13,08	4,45	28,74	2,72
3 Id.	433,75	58,01	32,26	328,44	15,04	44,32	13,34	4,84	22,97	3,17
4 Id.	438,87	59,65	32,13	332,26	14,83	53,54	13,18	4,78	33,04	2,54

TABELLA IX. — **Pane 3ª qualità**
« **Forni e Magazzini Cooperativi** ». — **Roma.**

DATA	RAZIONE					FECI				
	Sostanza secca	Sostanze azotate	Sostanze grasse	Sostanze idrocarbonate	Ceneri	Sostanza secca	Sostanze azotate	Sostanze grasse	Sostanze idrocarbonate	Ceneri
	gr.	gr	gr	gr.	gr.	gr.	gr.	gr.	gr.	gr.
9 febbraio 1898	463,83	62,33	31,99	354,83	15,18	55,89	14,39	4,51	34,10	2,89
10 Id.	458,84	62,13	32,26	349,94	14,51	60,33	15,28	4,93	37,48	2,64
11 Id.	464,26	62,06	32,08	354,48	15,64	54,78	13,83	4,57	33,21	3,17

In base ai dati raccolti nelle precedenti tabelle abbiamo voluto farci un' idea comparata dell'assimilabilità dei vari pani sperimentati. Valutando per ciascun periodo sperimentale le medie della sostanza secca e della sostanza azotata contenute nell'alimento ingerito *pro die* e quelle della perdita di esse per le feci, si viene facilmente a calcolare le perdite percentuali medie.

Meglio delle cifre assolute, queste ci danno un criterio esatto per valutare il grado di assimilazione di un dato alimento: noi le trascriviamo nella tabella che segue.

TAB. X. — **Assimilazione della sostanza secca e delle sostanze azotate.**

Media pro die.

QUALITÀ DEL PANE	% non assorbito della sostanza secca introdotta	% non assorbito della sostanza azotata introdotta
Pane 1ª qualità — Roma	4,46	17,30
Id. 2ª qualità — Roma	5,80	18,28
Id. 3ª qualità — Roma	8,30	20,40
Id. casalino — Valiani	10,30	18,80
Id. casalino — Civita Castellana . . .	10,48	19,07
Id. militare — Roma	10,78	21,23
Id. Integrale (Antispire) — Roma . .	18,46	34,45
Id. Cooperativa impiegati — Roma. .	11,14	22,30
Id. Forni e magazzini cooperativi — Roma.	12,30	23,30

Da questa tabella si rileva come l'assimilabilità della sostanza secca in toto e della sostanza azotata cambi col variare della qualità del pane. Si ha un massimo di assimilazione per i pani di 1ª e 2ª qualità e un minimo per il pane intero e completo (*antispire*). Un medio grado di assimilabilità è dato dai pani casalini e da quelli fatti su questo tipo.

I primi studi sistematici sull'assimilazione delle varie qualità di pane furono fatti in Germania. Meyer [1], sotto la direzione di Voit, nel 1871, intraprese una serie di ricerche sull'assorbimento della sostanza secca *in toto* e delle sostanze azotate di quattro qualità di pane. Queste furono: pane bianco (*Semmel*), pane usuale di segala e frumento, uso Monaco, pane di segala fermentato col sistema Horsford-Liebig, e pane scuro completo (*Pumpernickel*).

Ciascuna esperienza durò quattro giorni, durante i quali all'individuo di ricerca veniva somministrata una costante razione di pane cui erano aggiunti 50 grammi di burro e 2 litri di birra.

[1] *Ernährungsvesuche mit Brod am Hund. und Menschen.* Zeitschr. f. Biol. Bd. VII, p. 1, 1871.

I risultati medi delle perdite percentuali sono riassunti nella seguente tabella.

QUALITÀ DEL PANE	PERDITA percentuale per le feci	
	sostanza secca	sostanza azotata
Pane bianco (*Semmel*)	5,6	19,9
Id. pane misto, uso Monaco	10,1	22,2
Id. pane di segala Horsford-Liebig. . .	11,5	32,4
Id. completo (*Pumpernickel*)	19,3	42,3

Rubner [1], nel 1879, in un suo primo lavoro, eseguito nello stesso Istituto fisiologico di Monaco, studiò l'assimilazione di alcune qualità di pane e specialmente del pane bianco di frumento fermentato col lievito di birra (*Hefe*) e del pane scuro di farina grezza di segala e preparato col lievito comune (*Sauerteig*).

I risultati sono i seguenti:

QUALITÀ DEL PANE	PERDITA percentuale per le feci	
	sostanza secca	sostanza azotata
Pane bianco.	3,7	18,7
Pane scuro	15,0	32,0

In un lavoro posteriore (1883), lo stesso Rubner [2], ha eseguito altre ricerche col pane preparato con farina di frumento di varia provenienza e fermentato con lievito di birra. Il primo pane era fatto con farina di 1ª qualità al 30 %; il secondo con farina di media qualità al 70 %; il terzo con farina completa (*aus ganzem Korn*) proveniente da frumento previamente decorticato con speciale processo.

[1] *Ueber die Ausnützung einiger Nahrungsmittel im Darmkanale des Menschen.* Zeitschr. f. Biol. Bd. XV, p. 150, 1879.

[2] Loc. cit.

I risultati delle ricerche sono contenuti nella tabella che segue.

QUALITÀ DELLA FARINA ADOPERATA	PERDITA percentuale per le feci	
	sostanza secca	sostanza azotata
Farina 1ª qualità	4,03	20,68
Farina media qualità	6,66	24,56
Farina completa « *Wheat meal flour* »	12,23	30,47

Wicke [1] nel 1890 ha pubblicato i risultati di alcuni suoi esperimenti sull'assimilabilità del pane proveniente da farina di segala decorticata o no. Anche egli usò la dieta esclusiva e somministrò circa gm. 900 di pane al giorno. Detti risultati sono raccolti nella seguente tabella.

QUALITÀ DEL PANE	PERDITA percentuale per le feci	
	sostanza secca	sostanza azotata
Pane di segala decorticata	13,11	36,72
Pane di segala non decorticata	20,89	46,60

Esposte sommariamente le ricerche degli sperimentatori che primi si occuparono dell' importante questione dell'assimilazione del pane, facciamo seguire alcune osservazioni. Esse si riferiscono massimamente al lavoro del Rubner che di tutti è il più completo.

Non è detto, se l' individuo soggetto alle ricerche del Rubner, era abituato ad un vitto esclusivo di pane. Egli fa notare che, in Germania, è difficile di trovare delle persone che si prestino, per più di tre giorni, ad una alimentazione così monotoma e poco piacevole. Rubner poi non ha punto curato di preparare l' individuo nei giorni precedenti all'esperienza. Infatti, questi passò repentinamente da una dieta mista (pane, carne, insalata) ad una di solo pane, necessariamente po-

[1] *Die Decortication des Getreides und ihre hygienische Bedeutung*. Arch. f Hygiene, Bd. XI, 1890, p. 335.

vera di azoto e deficiente di grassi, tanto più che vennero del tutto esclusi i condimenti. Inoltre, come giustamente osserva il Bunge [1], le difficili e diligenti ricerche di Rubner, furono praticate su bevitori di birra. Molti fatti c' inducono a credere che la birra disturbava, in qualche modo, la digestione nel suo soggetto di ricerca. Questi infatti aveva flautolenze notevoli, anche durante l'uso del pane bianco, e, nei giorni che mangiò il pane, fatto con farina completa, aveva di più, oltre la flautolenza, una sensibile sete.

La stessa pecca deve farsi alle ricerche del Meyer ed in genere a tutti gli sperimenti sul ricambio materiale, fatti nell'uomo dai fisiologi tedeschi. *La prima cosa, dice il Bunge, che devesi ricercare in un esperimento scientifico è la semplicità delle indagini. Non si debbono introdurre dei fattori che non sono necessari e che perciò possono rendere meno chiaro ed evidente il risultato.*

Nelle nostre esperienze evitammo di escludere, a differenza del Rubner, ogni condimento, poichè, per il nostro contadino sarebbe stata una cosa anormale. Per la qualità e quantità somministratane non si aveva che una trascurabile influenza sulla composizione *in toto* della razione. Così non si verificò quelta ripugnanza e difficoltà a cibarsi di pani di qualità inferiori, come avvenne per il soggetto del Rubner, il quale, durante l'uso del pane completo doveva fare quasi una forzata introduzione delle ultime porzioni di pane, agevolando la deglutizione colla birra e l'acqua.

Dalle ricerche di Meyer, Rubner e Wicke non si può dedurre quale influenza esercitino, sul grado di assimilazione delle differenti qualità di pane, il vario processo di macinazione, fermentazione e cottura.

Ma Menicanti e Prausnitz [2] nel 1893 intrapresero una serie di ricerche per stabilire l' influenza delle sopra ricordate condizioni. Notevoli sono i risultati che si riferiscono ai pani provenienti dall' istessa farina, e fermentati con diverso metodo. Anche i detti ricercatori adottarono, per i due loro soggetti, una dieta esclusiva di pane. Nella tabella che segue riportiamo i dati relativi.

---

[1] Loc. cit., p. 63.
[2] Loc. cit.

QUALITÀ DELLA FARINA E FERMENTAZIONE	Individui	PERDITA percentuale per le feci	
		sostanza secca	sostanza azotata
Frumento e segala, *Hefe*	R.	7,23	17,83
	N.	5,83	15,80
Frumento e segala, *Sauerteig*.	R.	7,85	19,60
	N.	6,22	17,00

Dai risultati or ora riferiti, Menicanti e Prausnitz vennero alla conclusione che coll' ingestione del pane proveniente dall' istessa farina, ma fermentato, ora con il lievito comune, ora con il lievito di birra, si ha un'eliminazione minore per le feci della sostanza secca, e delle sostanze azotate, in quest'ultimo caso.

In un lavoro recente (1897) Plagge e Lebbin[1] comunicano alcune loro esperienze sull'assimilazione del pane usato dal soldato prussiano, preparato dalla farina di segala col 15 % di crusca. In media compare nelle feci il 13.2 % della sostanza secca e il 43.4 % delle sostanze azotate. Il pane, preparato con buona farina di segala, verrebbe assimilato altretanto bene come quello proveniente dalla farina di frumento; e la farina di segala viene tanto meglio assimilata quanto meno contiene di crusca.

Riportiamo nella tabella che segue le perdite percentuali per le feci della sostanza secca e delle sostanze azotate delle varie qualità di pane da noi studiate, in comparazione ai risultati avuti per i pani di frumento dai vari sperimentatori.

[1] *Untersuchungen ueber das Soldatenbrot Veroffentlichungen aus dem Gebiete des Militärsanitätswsen*. Berlin, 1897.

TABELLA XII.

QUALITÀ DI PANE	PERDITA percentuale per feci		AUTORI
	sostanza secca	sostanza azotata	
Pane fino (Semmel).	5,6	19,9	Meyer
Id. completo (Pumpernickel).	19,3	42,3	»
Id. fino (Weissbrot). . . .	3,7	18,7	Rubner
Id. di farina fina.	4,0	20,7	»
Id. di farina media. . . .	6,6	24,6	»
Id di farina « wheat meal flour »	12,2	30,5	»
Pane di frumento decorticato.	4,9	13,4	Menicanti e Prausnitz
Id. di frum. non decorticato.	7,2	17,4	»
Id. Id.	6,3	16,5	»
Id. frumento 1ª qual. - Roma.	4,5	17,3	Iacoangeli e Bonanni
Id. id. 2ª qual. - Roma.	5,3	18,3	»
Id. id. 3ª qual. - Roma.	8,3	20,4	»
Id. casalino - Valiani . . .	10,3	18,8	»
Id. casalino - Civitacastellana	10,4	19,1	»
Id militare - Roma. . . .	10,9	21,2	»
Id integrale « Antispire » - Roma	18,5	34,4	»
Id. 3ª qual. « Cooperativa impiegati » - Roma	11,1	22,3	»
Id. 3ª qual. « Forni e molini cooperativi » - Roma. . .	12,3	23,3	»

Può sorgere la questione se le stesse differenze, verificate coll'ingestione esclusiva o quasi esclusiva delle diverse qualità di pane, si avverino anche allorchè questo sia assunto con una dieta mista.

Il primo che ha sperimentato in questo senso fu il Prausnitz[1].

Questi, in un lavoro quasi contemporaneo a quello fatto con Menicanti, riferisce i risultati delle sue ricerche eseguite su due individui.

---

[1] *Ueber die Ausnützung gemischter Kost bei Aufnahme verschiedener Brotarten.* Archiv f. Hygiene, Bd. XVII. p. 626, 1893.

Da esse chiaramente appare che l'assimilazione dell' alimento è dipendente dalla qualità del pane usato. L'assimilazione migliore si ha col pane di prima qualità di frumento, la peggiore col pane di segala. Di più l'assimilazione non dipende solo dalla qualità dei cereali, ma anche dal processo di macinazione: tanto più la farina è fine tanto meglio è assimilata, per cui la farina grossolana di segala e di frumento colla quale si prepara il pane del soldato tedesco dà un pane in cui la perdita delle sostanze azotate è rilevante.

La dieta mista, adottata da Prausnitz, fu pane, carne, patate, latte, burro e birra.

Conducendo in questo modo le ricerche (dieta mista) egli fa giustamente osservare che è più razionale parlare di maggiore o minore quantità di feci che di alimenti più o meno assimilati.

Egualmente, con alimentazione mista, sperimentarono Pagliani e Mazza [1]. Il loro scopo fu di studiare il valore nutritivo di tre qualità di pane, pane bianco comune, pane militare della gurnigione di Torino e pane integrale, l' *Antispire* di Roma.

Dalla differenza fra la quantità d' azoto introdotto e quella di azoto uscito per le orine e per le feci vennero alla conclusione che « l' effetto « utile dell'alimentazione col pane integrale, sistema Desgoffe Avedyk, « è di regola superiore a quello del pane militare e più ancora di « quello del pane bianco comune ».

Albini [2], nella seduta del 5 marzo 1898 della R. Accademia delle scienze fisiche e matematiche di Napoli, riferì alcune osservazioni critiche sul detto lavoro. Servendosi delle cifre delle esperienze di Pagliani e Mazza ha compilato due quadri che riguardano il pane militare e l' integrale. Da questi quadri l' A. ha tratto uno sfavorevole giudizio sul grado di assimilabilità del pane integrale. Invero gli individui alimentati con quest' ultimo perdevano per le feci il 38 p. cento dell'azoto introdotto col pane, mentre quelli alimentati col pane militare perdevano solo il 31 p. cento.

Inoltre, mentre coll' integrale l' azoto delle orine era di gr. 28.75, cioè nella proporzione di 1.14 per ogni unità d' azoto del pane; con quello militare, invece ne era emesso gr. 3.19 in più, cioè 1.34 per ogni detta unità.

---

[1] *La panificazione integrale. — Rivista d'Igiene e Sanità pubblica.* Torino, febbraio 1898.

[2] *Considerazioni sul valore nutritivo del pane integrale.* Rendiconto della R. Accademia delle scienze fisiche e matematiche di Napoli. Fascicolo. 3°, marzo 1898

*

Siccome l' azoto nelle feci rappresenta della sostanza azotata non digerita, e quello delle orine, non potendo essere che sostanza digerita, assimilata, (albumina circolante) l'Albini, dai risultati delle esperienze di Pagliani e Mazza, deduce che « se il pane integrale od *Antispire* « può essere raccomandato per l'economia della borsa, non è al certo « il tipo di pane che più si presti per l'economia animale ».

Della stessa opinione è il Serafini [1]. Questi contemporaneamente all'Albini, ha calcolato per i diversi pani sperimentati dal Pagliani e Mazza, le perdite percentuali, per le feci, dell' azoto e degli altri componenti la razione. Ha notato che le dette perdite sono maggiori col pane *Antispire* che con quello militare.

Già Sommerfeld [2], che lavorò sotto la direzione di Baginsky, era venuto nel 1897 alle conclusioni identiche cui pervennero Pagliani e Mazza. Conviene però notare che i soggetti di ricerca furono dei fanciulli degenti per traumi o convalescenti nell' ospedale per i bambini « Imperatore e Imperatrice Federico ».

Recentemente Brazzola [3], nella seduta del 27 febbraio 1898 della R. Accademia delle scienze dell'Istituto di Bologna, riferì una serie di auto-ricerche fatte sul grado di digeribilità e assimilabilità del pane comune di Bologna e del pane integrale *Antispire* preparato in Roma.

Il detto sperimentatore non ricorse a una alimentazione esclusiva di pane, ma leggermente mista. Sulla guida delle ricerche istituite e dei risultati avuti, conclude per la bontà del pane comune bolognese e comparativamente per l'inferiorità del pane *Antispire.*

Già Rubner, nel suo secondo lavoro, studiò l'andamento dei processi fermentativi che si avverano nel tubo gastro-enterico coll'alimentazione esclusiva di pane e l'eventuale influenza che essi possono avere sulla putrefazione dei corpi albuminoidei. Osservò che in seguito a dieta esclusiva di pane non si trova indacano nelle orine o solo in traccie. Rubner crede che questa minore intensità dei processi putrefattivi enterici derivi dalla contemporanea fermentazione butirrica che si svolge nello intestino con una dieta sì ricca di idrati di carbonio. E questo suo modo di vedere è avvalorato dai fatti, già osservati dal Maly [4] e con-

---

[1] *Intorno alle pubblicazioni del prof. Luigi Pagliani sulla panificazione integrale col sistema Antispire. — La salute pubblica,* 1898.

[2] Vedi: *Le pain de froment entier sans mouture dit « Pain integral ».* Bruxelles 1897.

[3] *Sul valore nutritivo del pane di Bologna.* Rendiconto delle sessioni della R. Accademia delle Scienze dell' Istituto di Bologna, Nuova serie, Vol. 2°, 1897-98. Fasc. 2°.

[4] Vedi: Hermann' s Lehrbuch Bd. V. Th. 1, p. 239.

fermati dal Rovighi [1], circa l'influenza della fermentazione lattica sulla putrefazione dell'albumina nell'intestino.

Anche noi abbiamo voluto farci un'idea dei processi putrefattivi che si svolgono nel tubo enterico davanti l'alimentazione esclusiva di pane.

All'uopo, come indice di misurazione, ci siamo serviti della quantità degli eteri solforici eliminati a mezzo dell'orina. Essi furono determinati col processo Salkowski [2].

Di questi eteri solforici riportiamo i soli valori essoluti dall'eliminazione giornaliera e punto, come hanno fatto v. d. Velden [3] ed altri, li poniamo in rapporto coll'acido solforico preformato, inquantochè, secondo il v. Noorden, essi sono i soli attendibili.

TAB. XIII. — **Eliminazione dell'eter solforico.**

Media pro die.

QUALITÀ DI PANE	H^2SO^4 coniugato
Pane 1ª qualità — Roma	0,1797
Id. 2ª qualitá — Roma	0,2128
Id. 3ª qualità — Roma	0,2079
Id. casalino — Valiani	0,1997
Id. casalino — Civitacastellana	0,1903
Id. militare — Roma	0,2122
Id. integrale « Antispire » — Roma	0,2102
Id. Cooperativa impiegati — Roma	0,2129
Id. Forni e magazzini cooperativi — Roma	0,2104

Dalle cifre su riferite si rileva come, coll'alimentazione esclusiva di pane, l'eliminazione dell'acido solforico coniugato non abbia subito ap-

[1] *Gli eteri solforici nelle orine e l'antisepsi intestinale.* Rivista clinica. Anno 1891.

[2] *Ueber die quantitative Bestimmung der Schwefelsäure im Harn.* — Virchow's Arch. Bd. LXXIX p. 551.

[3] *Ueber die Ausscheidung der gepaarten Schwefelsäuren im menschlichenharn.* Virchow's Arch. Bd. LXX, p. 343, 1872.

prezzabili variazioni. Di guisa che possiamo dedurre che le putrefazioni enteriche, nel nostro caso, siansi mantenute nei limiti normali.

L'ultima questione che ci resta a trattare è quella del prezzo delle varie qualità di pane studiate sotto il punto di vista dell'assimilazione.

« Infatti, dice il Celli,[1] possono la fisica, la chimica, la fisiologia e
« l'igiene dire quello che vogliono sopra un dato genere alimentare,
« ma, nella nostra attuale società capitalistica, il prezzo è quello che
« principalmente regola il cibo così degli individui come delle classi
« sociali. »

Il prezzo apparente o commerciale di un alimento è ben diverso dal prezzo reale o nutritivo. Questo si ha riducendo l'alimento a sostanza secca e mettendo in rapporto il prezzo commerciale colle sostanze assimilate dall'organismo.

Su tale concetto si fondò il Rubner[2] nello stabilire il costo delle varie qualità di pane da lui sperimentate. Nel caso speciale del pane possiamo riferire, come con miglior criterio oggi si fa, il prezzo nutritivo alle sostanze azotate assimilabili.

Nella tabella che segue sono raccolti i dati relativi a questo quesito.

---

[1] *Pane integrale* - Nuova Antologia. Vol, 73, Serie 4ª, 1898.
[2] Loc. cit. — Zeitschr. f. Biol. Bd. XIX p. 93, 1883.

TABELLA XIV. — **Prezzo della sostanza azotata assimilabile.**

QUALITÀ DI PANE	COSTO per Kg.	SOSTANZA azotata ingerita Media pro die	SOSTANZE azotate assimilate °/o delle introdotte	PREZZO di 100 gr. di sostanza azotata L.	PREZZO di 100 gr. di sostanze azotate assimilabili L.
Pane 1ª qualità — Roma	0. 45	44. 98	82. 70	0. 76	0. 91
Id. 2ª id. id.	0. 40	55. 08	81. 72	0. 53	0. 63
Id. 3ª id. id.	0. 35	57. 37	79. 60	0. 44	0. 55
Id. casalino Valiani	0. 35	57. 50	81. 20	0. 44	0. 54
Id. casalino Civita Castellana	0. 35	62. 02	80. 93	0. 40	0. 50
Id. militare — Roma	0. 35	59. 69	78. 77	0. 42	0 53
Id. integrale « Antispire » — Roma	0. 30	58. 94	65. 55	0. 37	0. 55
Id. Cooperativa Impiegati — Roma	0. 34	59. 22	77. 70	0. 41	0. 53
Id. « Forni e magazzini cooperativi » — Roma	0. 35	62. 17	76. 70	0. 40	0. 52

Da essa si rileva che, il prezzo della sostanza azotata assimilabile, è molto variabile per ciascuna qualità di pane. Un massimo si ha col pane di 1ª e 2ª qualità, un minimo coi pani casalini, col pane militare e coi pani di 3ª qualità uso casalini, Il pane fatto di farina completa, (integrale, *antispire*) che si vende in Roma, anche da questo lato non offre alcun vantaggio, rispetto a questi ultimi; il prezzo della sostanza azotata assimilabile, benchè di poco, purtuttavia viene ad essere più elevato comparativamente alle altre qualità di pane.

Già le menzionate ricerche del Meyer [1] avevano dimostrato che, economicamente, è molto più vantaggioso nutrirsi col pane senza crusca, benchè il prezzo commerciale sia più elevato, di quello che col pane con crusca, ad onta che commercialmente sia a più buon mercato.

Adunque, da quanto si è veduto, chiaramente appare che i progressi che la tecnica moderna ha portato nell'arte di preparare le farine e fare il pane, tanto dal punto di vista biologico ed igienico che economico, non hanno corrisposto alle aspettative che si attendevano. Le farine complete, in qualunque modo prodotte, anche quelle derivate da cereali cui siansi operati speciali processi di decorticazione, danno sempre pani inferiori, tanto rispetto all'assimilazione che al costo,

Lehmann, [2] a proposito del pane Gelinck, pur convenendo nell'utilità di poter produrre con apparati semplici pani abbastanza gustosi con frumento non macinato, tuttavia osserva che il pane così ottenuto è sempre di difficile assimilazione, Sta anzi al di sotto dei pani militari che formano la razione dei soldati e molto si accosta ai pani scadenti della Germania del Nord. E Menicanti e Prausnitz [3] notano che mentre le parti centrali del grano danno la farina più fine e più assimilabile, le parti periferiche fino *ab antiquo*, sono state escluse dall'alimentazione umana e impiegate per gli animali, il cui apparato digerente può utilizzarle più facilmente e completamente che non possa far l'uomo. E Lebbin e Plagge considerano l'allontanamento della buccia e del cosidetto strato delle cellule del glutine come lo scopo più essenziale per la farina adatta a fare buon pane.

Questo concetto, che l'esperienza ha sanzionato, fu di già sostenuto dal Moleschott, il quale con frase felice diceva: « date ai polli la crusca, essi ve la ridaranno in carne ed uova. »

---

1 Loc. cit. p. 32.

2 *Hygienische Studien über Mehl und Brot*. Theil. VI. *Ueber ein direct aus den Getreidekörnern* (*ohne Mehlbereitung*) *hergestelltes Brot* (*Patent Gelinck*) Arch. f. Hygiene Bd. XXI. p. 247.

3 Loc. cit.

A tale corollario, sussidiati da tutte le riferite indagini sopra il grado di assimilazione di 9 qualità di pane, variamente preparato in Roma e provincia, perveniamo anche noi.

CONCLUSIONI.

1) I pani più assimilabili sono quelli di 1ª e 2ª qualità. Le perdite percentuali per le feci, della sostanza secca e delle sostanze azotate, sono, in media, rispettivamente 4,9 e 17,8. Il meno assimilabile è il pane intero o completo. Infatti le perdite percentuali col pane *Antispire* sono rispettivamente 18,5 e 34,4.

Un grado medio di assimilabilità offrono i pani commerciali di 3ª qualità, i casalini, il pane militare e quelli di qualità inferiore delle due società cooperative romane. Per il pane commerciale di 3ª qualità si ha una perdita, per cento, rispettivamente di 8,3 e 20,4; per i casalini, in media, di 10,3 e 18,9; per il pane militare 10,9 e 21,2; per quelli delle cooperative, in media, di 11,7 e 22,8.

2) In confronto al pane di 1ª e 2ª qualità e anche al pane intero o completo i pani di 3ª qualità e casalini forniscono un alimento in cui l'albumina assimilabile si ottiene al minore costo. Infatti 100 gr. di sostanze azotate assimilabili del pane di 1ª e 2ª qualità costano, in media L. 0,77; dell'*Antispire*, L. 0,55; dei pani casalini in media L. 0.52; dei pani di 3ª qualità e di quelli inferiori delle cooperative romane, in media L. 0,54.

3) Durante la dieta esclusiva di pane la putrefazione intestinale non subisce notevoli oscillazioni. Essa si mantiene entro i limiti ordinari. In vero l'acido solforico coniugato eliminato per le orine da un massimo di 0,2129 va a un minimo di 0,1797 gr. *pro die.*

4) La rassegna critica della letteratura sull'argomento conferma il favorevole giudizio sul grado di assimilabilità dei pani provenienti da farine fine e medie e quello sfavorevole per i pani preparati da farine complete o direttamente dal frumento non macinato.

TITOLI DELLE MEMORIE DEL FASCICOLO III

da ritagliarsi per le schede dei cataloghi per autori e per materie

---

614.43 + 614.49

BANDI Ivo e
STAGNITTA Francesco

Sulla trasmissione della Peste bubbonica per le vie digerenti.

Roma, *Ann. d'Igiene sperimentale.* Vol. VIII' (nuova serie) fasc. III, p. 291-305 **1898**

589.91 + 616.01

CASAGRANDE O.

Su alcune cause della non coltivabilità dei blastomiceti inoculati nell' organismo animale. — Ricerche.

Roma, *Ann. d'Igiene sperimentale.* Vol. VIII, (nuova serie) fasc. III, p. 306-317 **1898**

CASAGRANDE O. 589.91

Sulla diagnosi differenziale dei blastomiceti. — Ricerche.

Roma, *Ann. d'Igiene sperimentale.* Vol. VIII, (nuova serie) fasc. III, p. 318-353 **1898**

612.392.74

JACOANGELI T. e
BONANNI A.

Il grado di assimilabilità del pane. — Ricerche.

Roma, *Ann. d'Igiene sperimentale.* Vol. VIII, (nuova serie) fasc. III, p. 354-379 **1898**

614.43 + 614.49

BANDI Ivo e
STAGNITTA Francesco

Sulla trasmissione della Peste Bubbonica per le vie digerenti.

Roma, *Ann. d'Igiene sperimentale.* Vol. VIII, (nuova serie) fasc. III, p. 291-305 **1898**

589.91 + 616.01

CASAGRANDE O.

Su alcune cause della non coltivabilità dei blastomiceti inoculati nell' organismo animale. — Ricerche.

Roma, *Ann. d'Igiene sperimentale.* Vol. VIII, (nuova serie) fasc. III, p. 306-317 **1898**

CASAGRANDE O. 589.91

Sulla diagnosi differenziale dei blastomiceti. — Ricerche.

Roma, *Ann. d'Igiene sperimentale.* Vol. VIII, (nuova serie) fasc. III, p. 318-353 **1898**

612.392.74

JACOANGELI T. e
BONANNI A.

Il grado di assimilabilità del pane. — Ricerche.

Roma, *Ann. d'Igiene sperimentale.* Vol. VIII, (nuova serie) fasc. III, p. 354-379 **1898**

SOPRA UNA MALATTIA DEGLI OVINI

MEMORIA I

PEI DOTTORI

F. MERCANTI *Direttore*

S. DESSY *Vice-Direttore*

I.

Domina da parecchio tempo in vari punti della provincia di Buenos-Ayres, una malattia del bestiame ovino, che produce numerose vittime e arreca gravi danni nelle aziende in cui si sviluppa. Sino ad ora era stata osservata anche in molti altri stati di Europa e in Australia.

La malattia si presenta in forma epizootica e colpisce di preferenza gli agnelli della razza Lincoln, manifestandosi raramente e quasi eccezionalmente in mezzo alle femmine. Essa sembra prodursi nel momento in cui gli animali vengono tolti all'allattamento materno e nutriti sia nel campo, sia nelle stalle con alimento fresco o secco. Il corso della malattia è lento e dura generalmente varie settimane, terminando quasi sempre colla morte.

Gli agnelli ammalati presentano sintomi di malessere generale, tristezza, inappetenza; le materie fecali assai spesso, ma non costantemente, sono diarroiche; si osservano profonde alterazioni della nutrizione, a tal punto che paragonando gli animali infermi coi sani dello stesso branco e della medesima età, in quelli si nota come un arresto di sviluppo in confronto con questi. Spesso si produce un notevole dimagramento, ma questo carattere è ben lungi dall'essere costante, essendovi animali che muoiono allorquando hanno tuttavia un'abbondante quantità di adipe.

Più costante è l'anemia, la cui intensità varia, essendo talora poco accentuata, in altri casi di un grado abbastanza elevato, fino ad aversi un vero stato idroemico. Questi sintomi, che facilmente si manifestano anche alla osservazione superficiale, hanno fatto paragonare

la malattia a una cachessia acquosa, simile a quella che si attribuisce alla presenza dei distomi nei canali biliari; e come spesso si incontrano nel caglio degli animali malati, ed in gran quantità, dei vermi appartenenti al genere *Strongylus*, così molti allevatori credono che la malattia sia esclusivamente prodotta da questi parassiti, dal cui nome volgarmente viene chiamata *lombrig de las ovejas* (verme delle pecore): opinione questa la quale, come avremo occasione di dimostrare, non regge ad un serio esame.

Innanzi tutto si deve notare che sono molto incomplete le descrizioni che danno gli autori della malattia a cui si vorrebbe attribuire la presente mortalità del bestiame (*Strongilosi del caglio*, *Gastrite verminosa*, *Magenwurmseuche*). Le maggior parte degli autori che si sono occupati di siffatto studio, hanno avuto di mira specialmente il lato zoologico e sistematico della questione procurando di descrivere le varie specie di strongilo che si possono trovare nel caglio e le loro pretese relazioni con gli *Strongylus filaria* che simultaneamente in molti casi si riscontrarono nei polmoni.

Assai poco sappiamo dei sintomi clinici della malattia: è una specie di anemia perniciosa, dice il Neumann [1] i cui sintomi sono poco caratteristici e non permettono di stabilire un diagnostico preciso. E molto meno caratteristiche, aggiungiamo noi, sono le alterazioni anatomo-patologiche fin ora descritte: le lesioni della cachessia, i mutamenti di colore del fegato, la sua poca consistenza, la stessa poichilocitosi, descritta da Wernicke nel suo notevole lavoro sull'argomento, costituendo un quadro troppo comune per fondarvi sopra con sicurezza una entità nosologica.

L'unico sintomo patognomonico, per quanto dicono gli autori, che permette in modo sicuro di fare la diagnosi della malattia, consiste nella presenza degli strongili nel caglio. Però anche questo carattere si può discutere, potendosi molte volte trovare gli strongili in animali perfettamente sani, uccisi pel consumo e per altra causa, come è stato osservato frequentemente nell'Argentina [2] ed anche in Francia dal Rossignol. [3] E d'altra parte si possono trovare agnelli morti con tutti i sintomi della malattia e durante una epizoozia, nei quali mancano assolutamente gli strongili senza che sia possibile, in simili casi, di obiettare, come fanno Friedberger e Fröhner, che si è aspettato troppo

---

[1] *Traité des maladies parasitaires*, 2ª ed., pag. 354.

[2] Cfr. EVEN: *Estrongilosis cuajal en los borregos*. Rivista veterinaria. — marzo 1898.

[3] *Recueil de médecine vétérinaire*, n. 4, T. V, 1898, pag. 90.

a fare la autopsia, e che i parassiti sono stati rapidamente distrutti e digeriti sul cadavere; affermazione che deve essere provata, essendo una simile digestione postmortale ben problematica e contraria a tutto quanto sappiamo intorno alla fisiologia dell'apparato digestivo.

Questa discussione ci trarrebbe troppo lontano e preferiamo limitarci alla epizoozia regnante, e cominciare per esporre i resultati delle nostre ricerche anatomo-patologiche; avendo stimato indispensabile di determinare innanzi tutto colla massima esattezza quali sono le lesioni prodotte dalla malattia, per potere arrivare alla dimostrazione dell'agente patogeno.

I nostri studi furono fatti sopra vari agnelli provenienti da Lezama e da Chascomus, particolarmente dalle *estancias* dei signori Casalins, Cobos, Gibbius e Deytieux, cui siamo tenuti per le gentilezze usateci e per la cortese ospitalità. Il nostro collega ed amico dott. Griffin, della sezione veterinaria, ci ha accompagnato nelle varie escursioni e ci è stato utilíssimo pel lato chimico delle nostre ricerche.

II.

Ai 20 agnelli che servirono a queste ricerche fu fatta l'autopsia subito dopo averli uccisi, per disporre d'un materiale assolutamente fresco. Le lesioni riscontrate nelle diverse autopsie erano perfettamente simili in tutti i casi e solamente si distinguevano per l'estensione e la gravità; essendo gli animali verificati in vari periodi della malattia. Per questo invece di descrivere partitamente le diverse autopsie preferiamo dare una rapida sintesi dell'anatomia patologica di questa interessante malattia.

Caratteri generali. — Secondo il periodo della malattia, gli animali presentano una pallidezza più o meno spiccata della pelle e delle mucose visibili; la lana si lascia strappare con molta facilità; il tessuto cellulare sottocutaneo è povero e talora quasi privo di grasso. Le masse muscolari sono più pallide che normalmente: in alcuni casi il grado di magrezza è tale che si scorgono in modo evidente le parti salienti degli ossi. In conclusione i caratteri che si riscontrano alla ispezione esterna sono quelli che si osservano nelle malattie croniche cachettiche.

Cavità cranica e vertebrale. — Non si osserva nessuna lesione macroscopica nelle meningi, encefalo e midolla spinale, ma soltanto un forte stato di anemia.

Torace. — Quasi nella metà delle autopsie si sono trovate aderenze fra i due fogtietti della pleura, dovute a membrane connettivali, molto tenaci e in certi casi assai estese. Raramente le membrane si trovano agli apici polmonari, con maggior frequenza nel margine inferiore e superficie diaframmatica: in due casi esisteva una pleurite bilaterale recente, caratterizzata da essudato torbido, rossigno nella cavità pleurica e da sottili velamenti fibrinosi sulle superficie dei foglietti pleurali.

Generalmente il liquido pericardico è un po' aumentato ed ha i caratteri macroscopici, istologici e chimici di un trasudato: solo eccezionalmente presenta una debole opacità dovuta a globuli bianchi e cellule distaccate dalla sierosa: conservato fuori del cadavere, in pipette di vetro si congela rapidamente. L'epicardio conserva d'ordinario la sua lucidezza e trasparenza normali: l'adipe subepicardico presenta quasi in tutti i casi alterazioni abbastanza visibili, più o meno profonde. Negli animali meno magri, nello spessore dell'adipe si scorgono macchie di color bianchiccio, che risaltano sul fondo giallognolo; la loro estensione è variabile, mostrandosi in alcuni casi piccole e rotonde, simili a tubercoli submiliarici, in altri casi più estese, coi margini irregolari. Negli animali in stato di avanzato dimagramento si osserva la trasformazione gelatinosa del grasso subepicardico.

Talvolta in mezzo all'adipe che ha sofferto la metamorfosi gelatinosa persistono le chiazze biancastre già descritte, simulando perfettamente una lesione flagistica dell'epicardio. In un caso, peraltro, trovammo i segni non dubbi di una antica flogosi del pericardio, poichè esisteva una sinechia totale dei due foglietti di esso. Oltre le lesioni riscontrate nell'adipe subepicardico se ne osservano altre costanti, sebbene di differente gravità nel miocardio. Questo presenta un color giallognolo per anemia e degenerazione grassa: la sua consistenza è diminuita, a tal punto che si lascia lacerare dalle unghie: in alcuni casi si osservano emorragie puntiformi, o in forma di piccole macchie che dalla superficie esterna si affondano un poco nello spessore delle pareti cardiache. Gli orifici e gli apparati valvolari sono sempre assolutamente sani. Il sangue contenuto nel cuore è pallido e si coagula rapidamente formando un piccolo coagulo di color rosso scuro, circondato da una abbondante alone di siero color paglierino.

Nei polmoni le lesioni sono pressochè costanti ed identiche in tutti i casi. Solo in un caso su 13 trovammo i polmoni perfettamente sani sebbene nei bronchi esistessero, in gran quantità, dei vermi appartenenti alla specie *Strongylus filaria*, in vario grado di sviluppo.

Negli altri casi esistevano focolai più o meno estesi di broncopneumonite; talvolta rari, in altri casi perfino da 7 a 10 per ogni polmone:

generalmente l'affezione essendo bilaterale, ma in certi animali limitata ad un solo polmone. La forma di questi focolai era piramidale colla base rivolta verso la periferia e l'apice verso l'ilo del polmone: le dimensioni variabili, da quelle di un cece, a quelle di una grossa noce. Solo eccezionalmente i focolai confluivano fino ad aversi una bronco-pneumonite pseudolobare. L'aspetto di questi focolai broncopneumonici era diverso secondo la loro età. Se i focolai erano recenti si aveva un colorito rosso, somigliante a quello che suol riscontrarsi nella polmonite franca dell'uomo, al periodo della epatizzazione rossa: se invece si trattava di focolai più antichi si notava un colorito rosso slavato, quasi grigiastro, una maggiore consistenza, una minore quantità di succo al raschiamento, una minore friabilità. La pleura corrispondente ai focolai broncopneumonici recenti era leggerissimamente opaca ed alquanto arrossata; e in due casi rivestita da sottili stratificazioni fibrinose, mentre dai focolai più antichi prendevano punto di partenza le neomembrane connettivali che notammo sopra. Sulle superfici di taglio si vedevano chiaramente attorno alle boccucce bronchiali numerosi focalai di peribronchiti spiccanti pel loro colorito più pallido sul colore rosso o roseo del focolaio broncopneumonico. In un animale nello spessore di alcuni focolai broncopneumonici molto antichi esistevano dei noduletti d'aspetto caseoso circondati da una capsula fibrosa. Un identico nodo, grosso quanto un cece si trovava nel centro frenico del diaframma. Nei bronchi medi e piccoli corrispondenti alle zone infiammate si notava una piccola quantità di essudato d'aspetto vitreo ed una variabile quantità di vermi (*Strongylus filaria*). È notevole però che in un caso non esistevano focolai broncopneumonici sebbene nei bronchi fosse contenuta grande quantità di vermi, e che negli altri casi non esisteva una correlazione fra presenza di vermi nei bronchi e focolai broncopneumonici; poichè spesso il bronco corrispondente ad un focolaio broncopneumonico non conteneva vermi, mentre ne contenevano in copia le diramazioni bronchiali corrispondenti a zone di parenchima polmonare perfettamente sane. La quantità dei vermi era di solito molto notevole: di preferenza i parassiti occupavano il lobo inferiore del polmone, eccezionalmente esistevano pure nel lobo superiore. Le ghiandole peribronchiali erano d'aspetto e di consistenza normali.

Queste sono in complesso le lesioni osservate negli organi della cavità toracica, alle quali possiamo aggiungere l'esistenza frequentemente osservata delle chiazze lattee nell'adipe precordiale ed in quello che normalmente esiste lungo la colonna dorsale, in vicinanza dell'angolo costovertebrale, al disotto del foglietto parietale della pleura.

Addome. — Nella cavità peritoneale esiste di solito una piccola quantità di liquido limpido, senza colore, che si coagula prontamente se viene asportato dal cadavere con una pipetta di vetro. Talora questo liquido è leggermente opaco per la presenza di una certa quantità di leucociti. Il peritoneo è lucido e non presenta lesioni macroscopicamente apprezzabili. L'adipe del grande epiploon e quello del mesentere presentano le caratteristiche chiazze biancastre, che notammo nell'adipe mediastinico e sottoepicardico.

Quando la malattia è molto progredita e il marasma gravissimo manca nel grande epiploon e nel mesentere ogni traccia di adipe, ma vi persistono però talora le chiazze biancastre più volte notate.

Il fegato è di volume normale o leggermente aumentato, di colorito da rosso sbiadito a caffè e latte nei casi meno avanzati, giallognolo nei casi più gravi. La capsula del Glisson ha aspetto normale: la superficie esterna è perfettamente liscia al pari delle superficie di taglio, che lasciano unta la lama del coltello. Nulla di notevole nelle grosse vie biliari. La cistifellea contiene bile di colorito giallo verdástro talora molto chiaro. In circa la metà dei casi traverso al periepate trapariscono dei noduletti biancastri, i più grossi dei quali raggiungono le dimensioni di un chicco di panico ed hanno l'aspetto di ascessi miliarici. La milza non si presenta mai di volume aumentato: il perisplenio è di solito sugoso, spesso ed opaco; i follicoli malpighiani sono bene visibili, la polpa è di colorito rosso pallido. I *reni* sono di volume o normale, o leggermente aumentato. La superficie esterna del rene è liscia, pallida; le stellule del Verheyen non sono visibili. Sulle superficie di taglio, di solito è poco visibile il limite fra corticale e midollare, il colorito della sostanza renale è roseo slavato: nei casi più avanzati si vedono nella corticale strie manifestissime di degenerazione grassa. I bacinetti, gli ureteri e la vescica non presentano lesioni degne di nota, all'infuori del forte stato anemico che esiste in ogni parte del cadavere.

In quattro casi esistevano lesioni dell'*apparato genitale*, e cioè in due casi una vaginalite incipiente caratterizzata da chiazze di arrossamento e dalla presenza in corrispondenza di esse di alquanto essudato fibrinoso; in un caso un ascesso dell'epidídimo con vaginalite incipiente per propagazione del processo infiammatorio; nell'ultimo caso infine un orchite suppurata con trasformazione del testicolo in una grossa sacca, multiloculare, di pus cremoso, e con antica sinechia delle tonache vaginale ed albuginea.

Da parte del *tubo gastroenterico* si notano i seguenti fatti: L'esofago e le tre prime cavità dello stomaco non presentano lesioni ap-

prezzabili; il caglio contiene una varia quantità di strongili: però in due casi gli strongili mancavano completamente ed in circa la metà dei casi erano molto scarsi. Solo in un caso la mucosa del caglio era spalmata di una piccola quantità di sangue nerastro. Nei casi in cui esistevano gli strongili la mucosa del caglio presentava, in numero variabile, delle ecchimosi puntiformi. Nel tenue era di solito contenuto in discreta quantità un liquido di color giallo paglierino o giallo-bruno, in cui erano sospese delle particelle alimentari. La mucosa del tenue in qualche caso era leggermente arrossata e tumefatta; i follicoli solitari e le placche del Peyer erano talora modicamente tumefatti: le ghiandole mesenteriche normali o lievemente aumentate di volume. Il *cieco* e il *crasso* non presentano lesioni degne di nota: In alcuni casi furono riscontrati pochi individui delle specie *Tricocephalus affinis* e *Sclerostoma hipostomum.*

Nelle articolazioni non si osservano lesioni di sorta. L'apparato linfatico e il sistema vascolare si mostrano normali. La midolla delle ossa lunghe, anche negli stati anemici più gravi, non presenta che uno strato funzionante, molto sottile.

III.

A mano a mano che venivano praticate le autopsie, dopo raccolto, colle dovute precauzioni il materiale per le ricerche batteriologiche, si asportavano frammenti dei vari organi per le osservazioni istologiche. Per la fissazione vennero usati l'alcool, la soluzione satura di bicloruro mercurico, il liquido di Zenker, il bicromato al 3 °|₀, il liquido di Flemming. Le inclusioni vennero fatte a preferenza in paraffina: si usò la celloidina solo nei casi in cui le manipolazioni e colorazioni successive richiedevano un tal metodo di inclusione. Le colorazioni furono eseguite soltanto sulle sezioni. Si adoperarono per le colorazioni nucleari il carmoallume, la cocciniglia, l'emoallume di Mayer, la soluzione acquosa satura di bruno Bismark, la tionina in soluzione fenica (Nicolle) o in soluzione alcoolica (Nissl), la safranina; come colori protoplasmatici l'orange, l'eosina, l'acido picrico. I batteri furono ricercati nelle sezioni col bleu di mitilene di Loeffler, colla tionina fenica di Nicolle, col bruno Bismarck, col metodo del Gram. Per lo studio del sistema nervoso furono eseguiti il metodo celere del Golgi, quello di Weigert, modificato da Pal, pei pezzi fissati col bicromato; il metodo di Nissl, quello di Biondi-Heidenhain, col procedimento in-

dicato dal Trambusti [1] pei pezzi fissati col bicloruro; la picronigrosina e la fucsina acida sui pezzi fissati in alcool.

Cominciando dal *cuore* le lesioni istopatologiche si sono trovate sopratutto localizzate nelle fibre muscolari. Nei casi poco avanzati le strie trasversali delle fibre sono ben visibili, tanto nei preparati a fresco come nei tagli fatti col microtomo; nei casi più gravi al contrario le strie sono poco visibili o mancano completamente. Spessissimo si osserva la metamorfosi granulare e la degenerazione grassa, specialmente negli strati più interni del ventricolo sinistro.

Il fuso di sarcolemma che normalmente circonda il nucleo delle fibre muscolari del cuore è aumentato in modo notevole: lo stesso nucleo spesso si mostra alterato: talvolta è aumentato di volume, povero di cromatina, e ricorda da vicino le forme a placca descritte da Romberg; [2] mentre altra volta è diminuito di volume, raggrinzato, coi margini irregolari e si tinge male coi colori nucleari. In alcuni casi trovammo dei gruppi di fibre muscolari che erano aumentate straordinariamente di volume e in sezione trasversale mostravano una parte centrale scolorata, omogenea, o con struttura vacuolare, mentre la parte contrattile era respinta alla periferia e lasciava riconoscere abbastanza chiaramente la sua struttura fibrillare. L'epicardio non presentava lesioni degne di nota. Le alterazioni dell'adipe sottoepicardico saranno descritte insieme con quelle dell'adipe mesenterico, essendo ad esse perfettamente somiglianti.

Le alterazioni che si possono osservare nei *polmoni* sono diverse a seconda della antichità del focolaio infiammatorio. In tutti i periodi della malattia i bronchi nel distretto della zona infiammata appariscono ripieni di turaccioli di essudato purulento in mezzo al quale si vedono in varia copia cellule dell'epitelio bronchiale variamente alterate. La mucosa bronchiale è in parte sfaldata e si vedono qua e là nei preparati dei bronchi che non conservano più traccia del rivestimento epiteliale: dove ancora aderisce alla parete del bronco, l'epitelio si mostra tumefatto ed infiltrato di globuli bianchi, e, in alcuni bronchi, in via di attiva proliferazione. In molti bronchi al di sotto del rivestimento epiteliale, fra esso e la parete bronchiale, si vedono degli accumuli di globuli bianchi che sollevano quà e là l'epitelio staccandolo dalla parete del bronco.

---

[1] *Contributo allo studio della fisio-patologia della cellula epatica.* Roma, Pallotta, 1896.

[2] *Ueber die Erkrankungen des Herzmuskels bei d. Typhus abd. Scharlach und Diphtherie* (Arch. f. Klin. Med. 1891).

Il fatto che più specialmente caratterizza queste zone di flogosi polmonare è l'esistenza di numerosissimi focolai di peribronchite. Si può dire senza tema di errore che quasi ciascun bronco del focolaio polmonitico è circondato da un anello talora molto spesso di cellule purulente. Nei casi più avanzati l'essudato peribronchiale si organizza fino a trasformarsi in tessuto fibroso povero di nuclei.

Dal focolaio di peribronchite purulenta a quello di peribronchite fibrosa possono vedersi tutti i gradi intermedi, alcuni dei quali talora in uno stesso preparato. Per questo organizzarsi dell'essudato peribronchiale si ha nei casi più progrediti una vera cirrosi polmonare a punto di partenza peribronchiale, e nelle sezioni si vedono zolle di tessuto fibroso più o meno ricco di nuclei il centro dei quali è costituito da un bronco più o meno alterato.

Il parenchima polmonare presenta delle alterazioni degne di nota. Nei distretti infiammati i capillari delle pareti alveolari sono, specialmente nei focolai più recenti, dilatati e ripieni di sangue per un notevole grado di iperemia. Il contenuto degli alveoli non è eguale nei vari punti di un medesimo preparato. Infatti si vedono qua e là dei gruppi di alveoli la cui cavità è occupata da un abbondante essudato costituito quasi esclusivamente da globuli bianchi, mentre nella generalità degli alveoli l'essudato è meno abbondante ed ha un aspetto francamente catarrale, essendo costituito dall'epitelio degli alveoli desquamati e da un numero non molto notevole di globuli bianchi. In alcuni focolai broncopneumonici il numero degli alveoli con essudato purulento è quasi altrettanto notevole che quello degli alveoli ad essudato catarrale. Solo in due casi nei quali esistevano focolai broncopneumonici recentissimi il metodo del Weigert dimostrò l'esistenza di una non grande quantità di fibrina in mezzo agli elementi dell'essudato di alcuni alveoli polmonari. La pleura in questi due casi era iperemica ed infiltrata da globuli bianchi e rivestita da eleganti intrecci di fibrina, negli altri casi era inspessita, d'aspetto fibroso, talora poverissima di nuclei.

L'alterazioni che rivela il microscopio sul *fegato* sono di due sorta: degenerative e inflammatorie. Le prime sono esclusivamente rappresentate da due forme, la degenerazione grassa e le alterazioni nucleari. La degenerazione grassa, che invade il lobulo epatico è poco notevole nei casi non troppo avanzati, mentre che nei casi più gravi può essere tanto profonda da giungere a trasformare il lobulo epatico in una specie di reticolo le cui maglie son costituite dagli avanzi del protoplasma, cellulare e dei nuclei, e gli spazi limitati da queste maglie sono pieni da enormi gocce di grasso; di maniera che i nuclei sono

respinti alla periferia del corpo cellulare e si mostrano appiattiti e diversamente deformati. Altre degenerazioni si trovano nel nucleo. Pochi sono i nuclei che conservano l'aspetto normale: la maggior parte appaiono aumentati di volume e poveri di cromatina per idrope cellulare e cromatolisi: di queste alterazioni si possono vedere in una medesima preparazione i vari stadî.

Le alterazioni infiammatorie non si riscontrano in tutti i casi, e quando sono presenti, mostrano una estensione variabile. Difatti può trattarsi di una leggiera infiammazione parvicellulare negli spazi triangolari, o di vere collezioni purulente miliariche, che talora sono localizzate sotto e vicinissimo alla capsula del Glisson, e altre volte sono manifestamente in relazione cogli spazi triangolari dai quali sembrano originarsi. Difatti vediamo frequentemente che nelle parti più periferiche di queste collezioni si riscontrano piccoli vasi biliari in mezzo alle cellule purulente.

Gli elementi cellulari che costituiscono le collezioni purulente sono perfettamente intatti, non presentando nessuna metamorfosi regressiva. Alla periferia di questi piccoli focolai ascessuali spesso esiste uno strato sottile di connettivo neoformato, ricco di fibroblasti.

Nei *reni* le alterazioni sono localizzate prevalentemente nella sostanza corticale e sono lesioni esclusivamente degenerative. L'apparato glomerulare non presenta gravi alterazioni: in qualche caso fu osservata la degenerazione idropica del protoplasma dell'endotelio capsulare, e la deposizione nello spazio capsulare di una sostanza granulosa che si colorisce con i colori protoplasmatici e che molto probabilmente è albumina coagulata dai liquidi fissatori. Le alterazioni sono invece gravi e talora gravissime nell'apparato secernente. Nei casi poco avanzati l'epitelio dei canalicoli contorti, dell'anse dell'Henle e dei tratti intercalari si presenta tumefatto e di aspetto torbido, con piccole goccie di grasso qua e là: i nuclei sono bene dimostrabili con i colori nucleari sebbene appariscano qua e là poveri di cromatina per degenerazione idropica e per cariolisi. Nei casi più gravi si può giungere fino alla necrosi ialina dell'epitelio canalicolare. Il protoplasma cellulare contiene grosse bolle adipose che disturbano fortemente le cellule e schiacciano, variamente deformandolo, il nucleo.

Questo si presenta talora con caratteri normali, più spesso rigonfio, frammentato, povero di cromatina: talora è completamente scomparso, nè i vari artifici di colorazione valgono a scoprirne traccia: mentre gocciole di cromatina si vedono numerose o nel protoplasma cellulare o libere nell'interno dei canalicoli. Spesso la quantità dell'adipe esistente in una o più bolle sul protoplasma cellulare è tale che la cellula si

rompe e si disgrega in modo che il suo polo che guarda verso il lume canalicolare apparisce rotto e variamente sfrangiato. Molte cellule sono stanate dalla parete canalicolare ed appariscono libere nell'interno del canalicolo che ostruiscono in parte o totalmente. I canalicoli retti ed i collettori non presentano lesioni apprezzabili. Non esistono cilindri nei canalicoli. Lo stroma intercanalicolare non presenta lesioni di sorta; lo stesso dicasi dei vasi.

Rispetto alla *milza* non vi è nulla da osservare, fatta eccezione per forme di degenerazione nucleare simili a quelle che già abbiamo avuto occasione di descrivere.

Quanto agli *organi genitali* si studiarono solamente quelle parti che presentarono alterazioni alla necroscopia. Nei casi in cui esisteva una vaginalite incipiente, la vaginale si mostrava infiltrata da cellule rotonde qua e là aggruppate in piccoli cumuli specialmente in vicinanza dei vasi. I capillari e le piccole vene si presentavano fortemente iniettati. L'infiltrazione parvicellulare era più notevole sul lato della vaginale coperto dall'essudato. Questo era costituito da eleganti filamenti di fibrina ai quali erano commisti in discreta copia dei globuli bianchi. Nel caso in cui oltre la vaginalite esisteva un ascesso dell'epididimo, l'albuginea presentava le stesse lesioni della vaginale: l'essudato però era costituito da sole cellule purulente alle quali erano commisti in grande quantità degli spermatozoidi. Infine nel caso nel quale esisteva un'orchite suppurata di antica data, l'essudato era costituito da cellule purulente, molte delle quali presentavano evidenti fatti regressivi: i tramezzi che separavano le varie sacche ascessuali erano costituiti da fasci stipati di connettivo ricco di nuclei fusati ed infiltrati qua e là di cellule rotonde.

Per ciò che riguarda il *tubo gastroenterico* rivolgemmo in particolar modo la nostra attenzione al caglio e al tenue; al primo, perchè sede frequentissima di strongili, al secondo, perchè lo avevamo quasi sempre trovato ripieno di materie fecali liquide, sebbene questo fatto debba probabilmente mettersi in relazione non con uno stato patologico dell'intestino, ma con la causa stessa che aveva prodotto le lesioni degli altri organi e colle lesioni di alcuni di questi, specialmente del rene.

L'esame microscopico non rivelò se non piccole e scarse emorragie nello spessore della mucosa del caglio, nei casi in cui questi conteneva strongili; nè l'epitelio di rivestimento, nè l'apparato glandolare presentavano lesioni degne di nota. Il medesimo deve dirsi del tenue.

Alle chiazze biancastre osservate nell'adipe subepicardico ed in quello del grande epiploon, del mesenterio e del mediastino, corrispondono dei lobuli adiposi in cui alle cellule adipose è sostituita una sostanza fila-

mentosa a filamenti sottili e variamente aggrovigliati fra di loro, sostanza che non è di natura connettivale perchè non si colora con i metodi di van Gieson e di Ribbert, e non è fibrina perchè non si colora col metodo del Weigert. Con ogni probabilità si tratta di albumina precipitata dai liquidi fissatori, ma solo ricerche più continuate e più estese potranno forse deciderne con sicurezza la natura.

Nelle *articolazioni* non si osservò lesioni di sorta. Le midolla delle ossa lunghe, anche negli stati anemici più gravi, non presenta che uno strato funzionante molto sottile.

Nel *sangue*, oltre ad una diminuzione della quantità dell'emoglobina, che in taluni casi è ridotta a segnare 20 e 25 all'emometro di Fleischl, si osservano rilevanti alterazioni degli elementi. Il numero dei globuli bianchi, specie dei leucociti a nucleo polimorfo, è in alcuni casi alquanto aumentato: non si osservano alterazioni apprezzabili nella proporzione dei globuli a granulazioni basofile o eosinofile. I globuli rossi non presentano notevoli alterazioni di forma. Qua e là nei preparati si vedono dei globuli deformi, ovali o piriformi, o a riccio di castagna, ma sono l'eccezione.

Non possiamo quindi dire che esista in questi casi una poichilocitosi propriamente detta. Invece troviamo notevolmente alterate le dimensioni dei globuli rossi. Accanto a globuli che conservano le dimensioni normali, troviamo una discreta copia di globuli nani, che non raggiungono più di 2-3 μ ed un numero molto maggiore di globuli giganti, che raggiungono 8-10 ed anche 12 μ di diametro. I globuli giganti si riconoscono facilmente, oltre che per le dimensioni, pel fatto che si colorano con l'eosina e con la fuchsina acida molto meno intensamente che non i globuli nani o quelli di dimensioni normali. Uno studio citologico accurato del sangue nelle pecore spontaneamente ammalate e negli animali resi infermi, sperimentalmente sarà pubblicato quanto prima, insieme alle interessanti lesioni riscontrate nel protoplasma tanto nelle forme spontanee che in quelle sperimentali.

IV.

Quali conclusioni possiamo trarre dai dati che siamo venuti particolareggiatamente esponendo, per farci un'idea della natura della malattia? Le principali lesioni che si osservano costantemente ed hanno maggiore importanza, sono quelle che si riferiscono al sangue, ai polmoni, al fegato, ai reni. Il sintoma anemia sembra dominare il quadro della malattia e alle alterazioni del sangue sono forse dovute le lesioni

rappresentate dalle macchie biancastre trovate qua e là nel tessuto adiposo.

Quanto alla natura di questa anemia non può essere essenziale, poichè l'esame del sangue, praticato in tutti i casi, non ci ha mai rivelato la esistenza di parassiti endoglobulari o circolanti nel plasma: e le culture fatte dal sangue sui differenti mezzi nutritivi, aerobicamente ed anaerobicamente, sono rimaste sempre sterili.

Essendo quindi sintomatica, l'anemia non può essere cagionata, come è l'opinione volgare, dalla presenza dei vermi nel caglio. Il trovarsi i parassiti in animali perfettamente sani e il trovarsi animali ammalati senza parassiti, sono fatti sufficienti per respingere una tale ipotesi. Inoltre sarebbe difficile spiegare la anemia colla semplice presenza degli strongili.

L'idea che i vermi parassiti possano emettere prodotti tossici, sostenuta da Lussana a proposito dell'*Uncinaria Duodenalis*, non è stata confermata; e per quanto sappiamo delle tossine, queste non vengono assorbite dalla mucosa integra del canal digestivo, e le nostre investigazioni ci hanno dimostrato la sua integrità.

L'unica ipotesi ammissibile sarebbe quindi che i parassiti provochino l'anemia con ripetute sottrazioni di sangue: però contro la medesima militano vari fatti: che il sangue presenta piuttosto una ipoemoglobinemia che una forte oligocitoemia; che i punti emorragici nella mucosa del caglio, piccoli e scarsi, non stanno in relazione colla gravità della malattia; che in un solo caso su 20 autopsie si è trovata una scarsa quantità di sangue nel caglio, mentre che i ripetuti esami del contenuto gastrico e intestinale non hanno presentato le tracce della presunta emorragia: che finalmente il numero dei parassiti non è in relazione coll'intensità dell'anemia.

Le lesioni degli organi principalmente affetti sono di due specie: degenerative e infiammatorie. Le prime per la sua natura si potrebbero mettere in relazione collo stato anemico dell'animale: però non si può osservare nessuna proporzione fra la gravità di queste lesioni e quella dell'anemia: ciò che ci mostra che probabilmente non vi è tra loro relazioni di causa ed effetto, ma che sono prodotte tutte da una medesima causa.

Dei vari organi quelli che presentano le lesioni di più antica data, sono i polmoni, come prova la esistenza di aderenze pleuriche organizzate, e la trasformazione fibrosa dei focolai peribronchiali: ciò che ci fa sospettare che gli organi respiratori siano i primi affetti, come confermerebbe il fatto d'essere le lesioni polmonari le più costanti di tutte; l'unico caso in cui non le abbiamo trovate potendo

spiegarsi ammettendo che fossero passate a guarigione, esistendo ad ogni modo anche in quel caso uno stato flogistico dei bronchi.

Quanto all'origine di queste alterazioni è evidentemente bronchiale; le lesioni alveolari sono semplicemente dovute alla diffusione del processo bronchiale e peribronchiale. Quanto alle loro cause non può ammettersi che si trovi semplicemente nella presenza degli *Strongilus filaria* che così frequentemente si trovano nei bronchi degli animali. Avanti tutto questi vermi si possono trovare in animali perfettamente sani e di razza in cui di solito non si sviluppa la epizoozia: inoltre, come abbiamo avuto frequente occasione di osservare, le parti affette non stanno sempre in relazione con la sede dei vermi; nè la loro presenza nei polmoni, nè le stesse lesioni polmonari, molte volte scarse e limitate, potrebbero spiegare le lesioni degli altri organi e la profonda anemia, anche meno di quello che non lo possano i parassiti del caglio. Non per questo si deve negare ogni importanza a questi parassiti delle vie aeree, le lesioni irritative della mucosa bronchiale che necessariamente producono, potendo aprire, se non fosse altro, la porta agli agenti infettivi.

Mancando altre spiegazioni, sorge spontanea la ipotesi che questa malattia sia dovuta ad un agente di natura microbica. Il suo carattere epizootico, una possibile immunità o predisposizione di razza, i numerosi esempi che ci offre la patologia, ci confermano in questa opinione, la quale sola si conviene coll'insieme dei sintomi clinici e delle alterazioni anatomopatologiche e può spiegare allo stesso tempo l'esistenza dell'anemia, e le gravi alterazioni degenerative e infiammatorie.

Le ricerche batteriologiche ci hanno confermato quanto ci dava diritto di presumere l'esame delle lesioni anatomo-patologiche. In tutti i casi dal polmone, in vari dal fegato, in alcuni dal liquido pericardico e peritoneale (di questi in piccola quantità) abbiamo potuto isolare uno stesso microbo, i cui caratteri culturali ci permettono differenziarlo dai patogeni fino ad oggi conosciuti. In vari casi questo microbo lo abbiamo ottenuto in culture pure: in altri era accompagnato da vari microbi dovuti ad infezioni secondarie e ad invasioni facilmente possibili in animali tanto debilitati, la cui presenza obbliga ad andar molto cauto chiunque si occupa della microbiologia della malattia.

Il microbio che ha particolarmente fissato la nostra attenzione è patogeno per gli animali ovini, pei conigli e pei porcellini d'India: i suoi prodotti solubili iniettati negli animali da esperimento producono la morte in un tempo variabile, che con forti dosi può ridursi a 3 ore pei conigli, e 10-12 per le pecore; ottenendosi il quadro di una grave

intossicazione (congestione viscerale intensa, versamenti nelle sierose, trasudazione intestinale, emorragie della mucosa gastrica; ecchimosi sotto-sierose, nefrite, alterazioni del sistema nervoso).

È questo microbo la causa dell'attuale epizoozia? Questo lo potremo vedere soltanto in una prossima memoria, col concorso di numerosi esperimenti già fatti e di altri che ancora stiamo facendo.

Istituto d'Igiene della R. Università di Roma

RICERCHE SULLA AEROBIOSI DEL BACILLO DEL TETANO

PEL

Dott. FRANCESCO VALAGUSSA

Belfanti e Pescarolo,[1] nel 1889, isolarono dal sangue di un individuo colpito da tetano un microrganismo che viveva benissimo aerobicamente nei comuni substrati colturali ed era capace di riprodurre fatti convulsivi negli animali. Essi conclusero che il bacillo, da loro isolato simile a quello di Nicolaier si doveva considerare non come un anaerobio obbligato, ma come un anaerobio facoltativo.

Queste prime ricerche furono accolte con molto scetticismo poichè, da Nicolaier in poi, il bacillo del tetano si era ritenuto, e tutt'ora si considera, come un anaerobio assoluto con sede nel terreno, nelle feci, nella spazzatura, ecc.

Pochi erano stati gli sperimentatori che avevano rinvenuto il bacillo nel sangue.

Hochsinger,[2] per primo, aspirò del sangue dalla vena cefalica destra di un tetanico e lo versò in un tubo di siero gelatinizzato alla Koch. Dopo tre giorni di sviluppo a 37° vide comparire sul fondo della provetta una nulecola biancastra costituita da bacilli fini allungati colorabili col violetto di genziana: questi germi erano anaerobi. Inoculando il sangue del malato riuscì a riprodurre il tetano sugli animali, ma il sangue di questi, iniettato in altri animali, non dette nè contratture, nè convulsioni.

Anche Ohlmuller e Goldschmidt[3] riescirono ad isolare in coltura pura, dal sangue del cuore di un uomo morto per tetano, un bacillo capace di uccidere in diciassette ore un sorcio. Questo bacillo, secondo

[1] *Giornale della R. Acc. Med. di Torino*, maggio 1898.
Centralb. f. Bakt und Paras, pag. 283-306 Bd. VI, 1889.

[2] Centralb. f. Bakt. und Paras. Vol. II, 1887.

[3] Centralb. f. Klin. med., p. 569, 1887.

gli autori, doveva essere quello di Nicolaier. Sanchez Toledo per chiarire questo punto così dibattuto, sulla possibilità di diffusione del bacillo del tetano nel sangue dei tetanici, fece degli esperimenti coi quali dimostrò che: il bacillo del tetano non si trova in circolo negli animali morti di recente, ma ch'esso si versa nel torrente circolatorio soltanto quando il sangue, non potendo più rinnovare il suo ossigeno, crea un ambiente anaerobico pel quale, i pochi germi del tetano seminati negli organi, possono vivère.

Sanchez Toledo e Veillon,[1] inoltre, osservarono che nelle vecchie culture ad alto strato alla Liborius, il bacillo del tetano si sviluppa anche sulla superficie libera del terreno di cultura.

Queste ricerche vennero indirettamente a chiarire i risultati ottenuti da Belfanti e Pescarolo ed a provare che i loro esperimenti non erano errati o frutto del caso, ma erano la conseguenza di condizioni speciali stabilitesi nell'individuo tetanico, nel quale avevano fatto le ricerche.

Più tardi anche Vaillard e Vincent,[2] studiando l'azione degli agenti fisici sul bacillo del tetano, videro che per crescere, esso non ha bisogno della totale eliminazione dell'ossigeno, ma ch'esso può vivere e mantenere le sue proprietà anche in un ambiente relativamente ossigenato.

Wesbrook[3] studiò anch'egli l'influenza isolata e combinata dell'aria e della luce nelle colture di tetano: egli espose al sole queste colture ad alo strato (Liborius) lasciando che per alcune filtrasse l'aria attraverso il tappo d'ovatta; le altre, poste in contatto con dell'idrogeno, le chiuse alla lampada. Dopo venti giorni queste erano ancora attive e patogene per il sorcio, mentre le prime pur rimanendo in vita, non davano più tossina.

Nel 1892 il Belfanti[4] tornò sull'argomento confermando le sue prime ricerche.

Il Vincenzi[5] ed i suoi discepoli Righi[6] e Grixoni[7] ripresero gli studi del Belfanti giungendo a risultati differenti da quelli ottenuti da lui.

---

[1] *Arch. med. exper.* pag. 709, 1890.
[2] Ann. de l'Institut Pasteur, n. 1, 1891.
[3] *Journal of path. and backt.*, t. 1°, 70.
[4] *Arch. per le scienze mediche*, n. 4, 1892.
[5] *Nota critica.* — Rif. med., n. 35, febbraio 1893.
[6] *Rif. med.*, nn. 205-206, 1894.
[7] *Rif. med.* nn. 194, 195, 196 agosto 1895. « Il bacillo del tetano è aerobico ed atossico nel terreno ». Nuova teoria patogenetica.

Il Grixoni afferma d'avere isolato il bacillo del tetano allo stato aerobico da quei luoghi (spazzatura, calcinacci, terreno, ecc.), dove fino ad oggi s'era creduto vivesse anaerobicamente; inoltre, la spora di questo bacillo tetanico sarebbe secondo il Grixoni,[1] priva d'ogni virulenza. Dalle ricerche del Belfanti, invece, risulta che il bacillo del tetano allo stato aerobico è tossico, quanto quello ricavato da colture anaerobiche.

Questi fatti non mi sembrano privi d'interesse, poichè, se il bacillo di Nicolaier vivesse in natura allo stato atossico, difficilmente potremmo spiegarci i casi di tetano da trauma. D'altro lato se il bacillo del tetano potesse vivere tossico in presenza dell'ossigeno dell'aria, data la sua diffusione enorme, quanti non dovrebbero perire di tetano?

Nell'ambiente le condizioni d'aereobiosi sono le più comuni, mentre quelle d'anaerobiosi costituiscono l'eccezione e non è facile poterle accertare con sicurezza.

Ammesso che il tetano viva aerobico ed atossico nell'ambiente, il Grixoni per rendere concepibili i casi di tetano, invoca come indispensabile l'associazione microbica ed in special modo quella di alcuni microrganismi.

Il primo a far rilevare l'importanza dell'associazione microbica per esaltare la virulenza del bacillo tetanico fu il Tizzoni. Questa sua ipotesi fu confermata da molti e da alcuni fu detto ch'essa era indispensabile non solo per esaltare, ma anche per conferire il potere di fabbricare tossina.

È certo che l'associazione bacterica deve avere sul bacillo del tetano un'influenza non dubbia. È un fatto costante in batteriologia questa reciprocità d'azione di un microrganismo sull'altro, sia esercitando un antagonismo, sia favorendo l'attecchimento col diminuire la resistenza dei tessuti o coll'aumentare l'attività biochimica dei germi.

A questo proposito ricorderò l'opinione del Rossi-Doria[2] e del Sanfelice, i quali osservarono che il tetano si manifesta più facilmente negli animali inoculati con un miscuglio di bacilli del tetano e di comuni soprofiti, che non in quelli inoculati di soli bacilli privi di tossina. Questi autori però ritengono che ciò non dipenda da un aumento della virulenza del bacillo di Nicolaier, ma da una diminuita resistenza dell'organismo che deve difendersi contro parecchi agenti.

Vaillard e Vincent, a sostegno della teoria fagocitaria, dicono che associando il bacillo prodigioso alle spore di tetano, l'azione tossica di

---

[1] *Atti del VI Congresso di chirurgia in Bologna.*

[2] *Il Policlinico*, n. III, 1894.

esse aumenta, e ciò, secondo essi, dipende dal fatto che il bacillo prodigioso attira a sè l'attività dei fagociti e dà tempo alle spore di tetano di germinare.

Dal complesso di questi fatti, dalle divergenze nell'interpretazione di essi, dall'essere il bacillo di Nicolaier diffuso in natura più d'ogni altro microrganismo patogeno, volli studiare ordinatamente, i *rapporti morfologici che esistono fra bacillo del tetano aerobico e anaerobico; fra aereobiosi e tossicità, e quali sono le condizioni per le quali il bacillo di Nicolaier può diventare aerobico ed atossico; e, infine, se perduta la proprietà di dare tossina, esso può in qualche modo riacquistarla.*

L'ottenere delle colture aerobiche sarebbe, secondo il Righi, più un fatto dovuto alla fortuna che un fatto costante. Se quanto il Righi afferma fosse perfettamente esatto, ogni studio sia sulla morfologia, sia sulla biologia del bacillo di Nicolaier allo stato aerobiotico, sarebbe privo d'interesse non potendo portare il minimo contributo nè alla batteriologia nè alla patogenesi del tetano.

Recentemente Ferran ha osservato che prendendo una coltura pura di bacillo del tetano e mettendola in un'atmosfera pura di gas acetilene, alla quale si faccia mischiare dell'aria in proporzioni successivamente più forti, questo bacillo ritenuto anaerobio obbligato finisce col diventare perfettamente aerobio e forma alla superficie del brodo una spessa pellicola. Il microrgonismo non subisce alterazioni morfologiche.

Il Ferran considera erronea l'opinione della natura anaerobica obbligata del bacillo del tetano e ritiene che solo occasionalmente lo si debba considerare come tale. Esso si deve annoverare fra gli anaerobi facoltativi.

Facendo delle colture di tetano a colonie sparse secondo il metodo Libonis, avevo notato che facilmente i terreni di coltura s'inquinavano in superficie per caduta dei comuni germi dell'ambiente. Inoltre, se lo strato di terreno nutritivo che poggiava su quello in cui era stato seminato il bacillo di Nicolaier non era molto alto, avvenuto l'inquinamento in superficie, dopo tre o quattro giorni di termostato il bacillo del tetano cominciava a svilupparsi a pochi millimetri dalla superficie d'inquinamento. Nei giorni successivi (6°–7°) le colonie di tetano si sviluppavano anche al fondo del tubo di cultura.

Il bacillo del tetano ritrova certamente un terreno *optimum* per il suo sviluppo nei prodotti dei comuni saprogeni, tantopiù che lo sviluppo

[1] Centralblatt. f. Bakt., ecc. Vol. XXIV, n. 1, 1898.

di esso s'inizia in terza o quarta giornata, quando questi prodotti si sono diffusi nell'agar.

Seminati dei brodi con quei bacteri che riscontrai quasi costantemente sulla superficie inquinata dei tubi ad alto strato li coltivai per tempi differenti alla stufa a 37° (da 24 h. a 15 giorni). Trascorsi questi tempi vari, filtrai le colture allo Chamberland e dopo essermi assicurato che i filtrati erano sterili seminai su di essi il bacillo del tetano.

Dopo quattro a sei giorni esso cominciò a svilupparsi su tutti quei filtrati sui quali i comuni bacteri avevano vissuto almeno per tre giorni; inoltre potei stabilire, che nessuno dei microrganismi saprofiti esercitava un'azione elettiva favorendo più o meno la vita del bacillo di Nicolaier.

Perciò mescolai tutti i saprofiti che avevo adoperato nelle prime ricerche e con essi innestai dei matrocci contenenti 150 cc. di brodo.

I germi che seminai furono i seguenti:

a) Bacillo sottile;
b) » radiciforme;
c) » fluorescens non liquef;
d) » fluorescens liquef.;
e) » Proteus vulgaris;
f) » Proteus Zenkeri;
g) Sarcina rosa;
h) » lutea.

Come tempo medio di sviluppo scelsi i sette giorni, decorsi i quali filtrai allo Chamberland ed innestai il bacillo del tetano.

Mi sono servito di tre bacilli di Nicolaier di diversa origine e capaci di produrre una tossina potentissima: uno di essi esisteva nel laboratorio (tetano *a*); un secondo mi fu dato dal dott. Roncali (tetano *b*) ed un terzo fu trovato dal dott. Montesano in un caso di demenza paralitica.

Per il dosaggio della tossina, mi sono servito delle colture in brodo, nelle quali avevo fatto gorgogliare del gas idrogeno. Riferirò in seguito il valore tossico dei prodotti dei bacilli del tetano da me impiegati.

Oltre a queste colture di valore tossico noto, volli isolare direttamente da quei luoghi dove era stato riscontrato più frequentemente, il bacillo di Nicolaier.

I saggi prelevati furono quattordici; ricavati tutti alla profondità di 5 centimetri circa:

Quantità impiegata	LUOGO IN CUI FU RACCOLTO IL MATERIALE	Inoculazione negli animali	Colture
5 gr.	1. Giardino istituto d'Igiene (*A*)	tetano	tetano
5 gr.	2. Id. id. (*B*)	niente	niente
5 gr.	3. Polvere di strada (via Agostino Depretis)	tetano	tetano
5 gr.	4. Polvere della mia stanza di laboratorio	id.	id.
5 gr.	5. Spazzatura di una casa (*a*)	id.	id.
5 gr.	6. Id. id. (*b*)	niente	id.
5 gr.	7. Giardino dell'ospedale di S. Antonio	id.	id.
5 gr.	8. Terriccio lungo il Tevere	id.	id.
5 gr.	9 Calcinacci d'una cantina	tetano	id.
5 gr.	10. Concimi della campagna romana	niente	niente
5 gr.	11. Terra di Campo Salino (campagna romana)	id.	id.
5 gr.	12. Spazzatura dell'ospedale di S. Giovanni	tetano	tetano
1 gr	13. Alcuni ragnateli	id.	id.
1 gr.	14. Corteccie di fascine da forno	id.	id.

È noto, fino dai primi studi di Nicolaier che solo raramente si riesce a riprodurre il tetano negli animali inoculando direttamente il terreno, perchè altri microrganismi patogeni prendono facilmente il sopravvento (specie il bac. del carbonchio sintomatico). Queste ricerche furono poi confermate con grande corredo di esperimenti dal Sanfelice [1] e dal Marchesi. [2]

Il Marchesi, per liberarsi da tutti quei germi patogeni che potevano rendere incerto il risultato delle sue ricerche, pensò di aggiungere ai saggi di terreno passati per lo staccio di Knopp, una soluzione d'acido fenico. In tal modo la maggior parte dei germi moriva mentre le spore del tetano, assai resistenti, rimanevano in vita.

Per evitare l'aggiunta diretta di sostanze antisettiche che maltrattando la spora tetanica togliessero ad essa il potere di dare il veleno, preferii tenere il seguente metodo:

Filtrati attraverso lo staccio di Knopp (3 mill.), i campioni di terreno e presane una data quantità la mettevo in un matraccio Erlemmeyer della capacità di 300 cc. nel quale introducevo una piccola provetta contenente 5 cc. di cloroformio e turavo il matraccio con un tappo di caoutchouck lasciandolo alla temperatura dell'ambiente. Il cloroformio s'evaporava e l'atmosfera confinata diventava ben presto satura dei suoi vapori.

---

[1] Questi Annali, vol. I, fasc. IV, 1891.
[2] Questi Annali, vol. II, 1892, pag. 47.

Da una serie comparativa di esperimenti risulta:

a) dopo 24 h d'azione i vapori di cloroformio non uccidono la maggior parte dei germi contenuti nel terreno, ma ne ritardano lo sviluppo.

b) dopo 48 h tutti i microrganismi asporigeni sono morti.

c) dopo quattro giorni la maggior parte dei germi sporigeni muore; le spore tetaniche resistono benissimo.

Eliminata in tal modo gran parte dei germi, tentai di fare direttamente dal terreno le piastre aerobiche come aveva fatto il Grixoni, ma non ottenni mai lo sviluppo del bacillo del tetano.

Seminati nel tempo stesso dei tubi d'agar coi vari saggi e facendo delle colture ad alto strato, potei isolare con molta facilità il bacillo di Nicolaier, tagliando, secondo il metodo del Sanfelice, i dischetti d'agar che contenevano colonie di tetano

Fatte le piastre coperte e le infissioni in gelatina, studiai i vari caratteri morfologici che potevano confermare la diagnosi di tetano. « A questo proposito debbo aggiungere che in tutte le ricerche fatte, tanto nelle colture a piatto in agar, quanto su quelle in gelatina non mi fu mai possibile di sorprendere quel rimescolamento di granuli della colonia a cui il Vincenzi [1] ed i suoi due discepoli danno un'importanza capitale ».

Come risulta dalla precedente tabella, mentre da un lato feci le colture, dall'altro non trascurai d'inoculare nelle cavie delle emulsioni di terreno sottoposto ai vapori di cloroformio, ed in alcuni casi mentre s'ottenne sviluppo sui terreni di coltura, l'inoculazione negli animali dette risultati negativi.

Ottenute queste colture allo stato puro, seminai con esse i filtrati su cui avevano vegetato per sette giorni i saprogeni.

Dopo 48 h di sviluppo del bacillo del tetano su questi terreni già sfruttati dai saprogeni (ossia in quinta ed in sesta giornata) innestai dei tubi di brodo di carne di cavallo fresca e peptonizzati all'1 °/₀ (peptone Witte).

Ventiquattro ore dopo l'innesto sulla superficie dei brodi si potè osservare un'esile pellicola, che precipitava facilmente al fondo. I brodi s'intorbidavano da prima lievemente ma lasciati in riposo diventavano limpidi. Dopo sei sette giorni sul fondo dei tubi di coltura si osserva un deposito biancastro abbondante.

I terreni ricchi di prodotti di altri microrganismi sono adunque molto adatti per lo sviluppo del bacillo di Nicolaier.

Questo fatto biologicamente importante si presenta costante. E non credo che si debba interpretare questa vita del bacillo del tetano su prodotti bacterici, come dipendente da un consumo d'ossigeno da parte dei saprogeni, giacchè nei filtrati l'ossigeno dell'aria si ridiscioglie, ma soltanto come un optimum di terreno colturale per il bacillo di Nicolaier.

[1] Rif. Med. 177-178, 1895.

Facendo da questi brodi i trapianti sui terreni di coltura più comuni, si possono stabilire i seguenti caratteri morfologici e colturali del bacillo del tetano abituato alla vita aerobica:

Goccia pendente - Forme bacillari lunghe (2,1-3,9 μ) rifrangenti alla luce, perfettamente immobili.

Colorazione. Si colora con tutti i colori d'anilina e col metodo di Gram. Nei preparati colorati v'è uno spiccato poliformismo. Si osservano:

1) forme sottili fini (simili a setole) brevi;

2) forme lunghissime, benissimo colorabili e costituite da tanti bastoncini corti, disposti a catena (streptobacillari);

3) forme lunghissime simili alle precedenti che si colorano però assai male a freddo e poco a caldo;

4) forme corte, grosse, a estremità arrotondate, talora portanti una spora terminale (forme a bacchetta di tamburro). Sono di solito scarse e quando il bacillo di Nicolaier s'abitua all'ossigeno dell'aria finiscono con lo sparire;

5) forme corte sottili portanti una spora laterale a guisa di gemma od una spora centrale, cosicchè il bacillo diventa fusato;

6) forme a manubrio con spore terminali ad ambo gli estremi.

Spore. — Colorate col metodo del Fiocca o con quello di Ziehl-Neelsen, presentano una parte periferica intensamente colorata (membrana). Sono per la maggior parte libere, di forma ovoidale o rotonda (forme coccacee del Belfanti).

Piastre su agar. — Le colonie sviluppatesi su agar sono molto caratteristiche. Dopo 24 h presentano i seguenti caratteri: colonie biancastre, rotonde, con nucleo centrale piccolo irregolare, sollevate sul terreno nutritivo, a margini regolari, talora pallidamente dentellati. Osservate a piccolo ingrandimento si presentano finamente granulose; ad occhio nudo si vedono costituite da piccole scagliette che a luce refratta dànno ad esse un aspetto madreperlaceo con bellissime iridescenze. Lasciate le piastre per due o tre giorni alla stufa si forma un alone concentrico alla prima colonia, cosicchè la parte centrale si presenta più oscura, poi si vede un alone un po' più chiaro ed attorno a questo un anello. *Nell'insieme la colonia ha l'aspetto d'un bersaglio.*

Le colonie profonde sono giallastre, globose a contorni netti e non presentano nulla di caratteristico.

Colture a piatto in gelatina. — Colonie piccole del diametro di tre a quattro millimetri. Dopo 24 h-36 h di sviluppo a 20° sono poco appariscenti e non sollevate dalla superficie. Esse sono simili a quelle che si ottengono in piastra coperta, ossia: si nota un nucleo centrale

bianco-giallastro, ben manifesto e finamente granuloso; attorno ad esso si forma una fine raggiera divergente, quale i raggi d'una ruota. Su questi si notano altri raggi che partendosi in senso serpiginoso dalla periferia del nucleo della colonia s'incrociano divergendo.

Le colonie profonde non differiscono da quelle superficiali, sono più piccole e presentano raggi più brevi. *La gelatina non produce alone di fusione che dopo 20-25 giorni e talora dopo i 30 giorni.*

Colture su patate. — Sviluppo scarsissimo; dopo cinque o sei giorni si osserva una patina sottilissima, biancastra, poco lucente, e facilmente allontanabile. Lasciando invecchiare la coltura, la patina ingiallisce ed è un po' più appariscente.

Colture in agar per strisciamento. — Le colonie sparse sono simili a quelle descritte per le colture a piatto. La patina che si forma dopo 18^{h}–24^{h} è biancastra, poco lucente, alquanto iridescente nei primi tempi di sviluppo. Se le colture si lasciano invecchiare alla stufa a 37° (10–15 gioni) l'agar assume una tinta ocracea e la patina diventa attaccaticcia, giallastra, difficilmente distaccabile con l'ago di platino e non emulsionabile nei terreni liquidi. Non si ha sviluppo di bolle di gas e mai emana da esse l'odore speciale, detto di corno bruciato, che hanno le colture anaerobiche.

Colture in agar per infissione. — Si ha uno scarsissimo sviluppo in profondità: lungo il tramite dell'infissione si osservano dei granuli finissimi giallastri. Lo sviluppo è assai rachitico ed in superficie attorno alla puntata si vede una patina molto circoscritta,

Colture in gelatina. — Lungo il tramite si osserva, in terza giornata, uno sviluppo scarso omogeneo poco visibile. Nel tempo stesso sulla superficie libera della gelatina si forma una patina biancastra, piuttosto spessa, che da prima sta localizzata al punto dell'innesto, poi si va a poco a poco estendendo, e dopo otto o dieci giorni ha invaso tutta la superficie del tubo di coltura. La fusione non si m anifesta che in ventesima o venticinquesima giornata ed è assai lenta tanto che, dopo quaranta giorni essa non ha progredito che di pochi millimetri nel cilindro di gelatina.

Colture su siero solidificato. — Nen presentano nulla di caratteristico e sono simili a quelle che si ottengono su agar. La fusione del siero si ottiene tardivamente ed a parità di condizioni precede di poco la fusione della gelatina.

Gelatina zuccherata. — Sviluppo simile a quello della gelatina ordinaria.

Latte. — Non coagula, nessuno sviluppo manifesto; vive però bene.

Brodo. — Ho già accennato alle colture in brodo, ricorderò soltanto

che lo sviluppo in superficie continua fino a 40-50 giorni e che mano mano avviene la formazione delle pellicole, esse precipitano al fondo lasciando limpido il brodo. Non si osserva mai sviluppo di gas come neppure si sente il puzzo delle colture anaerobiche.

Descritti i principali caratteri morfologici è importante studiare il bacillo del tetano allo stato aerobico nei suoi vari stadi di sviluppo; ossia dall' inizio dell'adattamento all'aerobiosi fino al 160° giorno di vita aerobica corrispondente al trentaquattresimo passaggio sui comuni terreni di coltura. Non credo il caso di ricordare, come termine di confronto, la morfologia dei bacilli del tetano che vissero anaerobicamente.

Nel primo e secondo passaggio sui terreni aerobici esistono le forme setolose in prevalenza, ma si osservano pure in gran numero le forme capocchiate e le spore libere. In seguito compaiono le forme lunghe che s'intrecciano fra di loro (tipo *streptotrix* e scompaiono le forme a bacchetta di tamburo; persistono invece le forme coccacee libere. Negli ultimi passaggi pure le forme lunghe diminuiscono e diventano mal colorabili coi comuni colori d'anilina.

Anche per la produzione di tetano tossina sembra che la morfologia abbia dei rapporti: infatti i primi trapianti aerobici dànno nelle cavie e nei sorci le note contratture, però bisogna impiegare delle colture che non siano rimaste in termostato più di 24 h. Ciò credo sia dovuto al fatto, già dimostrato dal Tizzoni, da Fermi e Pernossi, ecc. ecc., che la tetano tossina perde il suo potere se è mantenuta a temperatura relativamente alta. D'altro canto essendo il veleno del tetano molto potente, può darsi che nei primi passaggi sulle colture aerobiche ne rimanga aderente ai bacilli che costituiscono la patina, una piccola quantità sufficiente per riprodurre le contratture spasmodiche sui piccoli animali.

Già al secondo ed al terzo passaggio in colture aerobiche, inoculando intere patine delle colture in agar e quantità notevoli di colture in brodo (fino a 70 cc. progressivamente in una cavia), con le prime non ottenni mai nessun effetto, con le seconde osservai soltanto un lento dimagramento degli animali.

Pare adunque che nè la spora libera, nè le forme a *streptotrix*, nè le forme setolose che vivono bene aerobicamente, siano capaci di dare in tali condizioni tetano tossina. La scomparsa totale della tossicità avviene quando i bacilli spilliformi non si osservano più e quando appaiono le forme allungate filamentose.

Nicolaier stesso aveva osservato che nei focolai traumatici esistenti in individui colpiti da tetano, le forme predominanti erano quelle capocchiate od a bacchetta di tamburo.

Il Sormani, [1] in seguito, esaminando il pus tetanigeno di ferite di uomo e d'animali non trovò direttamente il bacillo capocchiato se non per eccezione, ma le colture di quel pus svilupparono sempre i bacilli caratteristici.

Non voglio affermare che la facoltà di produrre tetano tossina stia legata con questo modo speciale di presentarsi del bacillo di Nicolaier, ma soltanto ricordo questa coincidenza di fatto.

Nulla d'importante, nè di diverso da quanto è noto per gli studi del Sanfelice, ho potuto rilevare per ciò che riguarda la morfologia dei bacilli del tetano isolati atossici dal terreno.

Riassumendo questi risultati si può dire che:

a) il bacillo di Nicolaier isolato anaerobico si può adattare a vivere aerobicamente.

b) il bacillo di Nicolaier tossico divenuto aerobico perde la proprietà di produrre tossina.

c) la facoltà di produrre tetano tossina sta in un certo rapporto con alcuni mutamenti morfologici.

d) dal terreno non si riesce ad isolare direttamente il bacillo di Nicolaier allo stato aerobico.

Da queste esperienze si comprende che il bacillo del tetano trova in natura quelle condizioni sufficienti per cui la spora può germinare in presenza dell'ossigeno dell'aria e privarsi in tal modo del potere di dare tossina.

A prima vista mi si potrebbe obbiettare che le feci ed i terreni concimati sono quasi costantemente tetanigeni. Dalle mie ricerche questo fatto non risulta costante, ed il bacillo del tetano s' è mostrato alcune volte atossico là dove maggiore è la quantità di sostanze organiche (terra di giardino, concimaie, ecc.) mentre manterrebbe meglio la propria tossicità in quei luoghi meno adatti per lo sviluppo di bacteri, (polvere di laboratorio, fascinetti, ecc.).

Dalla tabella risulta ancora che nei saggi di terreno raccolti a Campo Salino (terreno palustre pieno di sostanze organiche vegetali ed animali) e nelle concimaie che stanno all'aria aperta nella Campagna romana, non ottenni mai sviluppo di bacilli del tetano sui terreni anaerobici nè tetano negli animali. Ora, appunto in quei raggi la sostanza organica trova quelle condizioni di luogo e di temperatura per cui i comuni saprogeni possono vegetare unendo ai loro prodotti quelli del disfacimento di essa. La spora tetanica può in tali condizioni germinare, dare forme bacillari che diventano aerobiche ed atossiche.

[1] Bull. Acc. Med. di Roma, anno 1888-1889, fasc. VIII.

A conferma del fatto ricorderò che il Sormani [1] aveva notato che la terra tetanigena, quando anche difesa dalla luce e dall'umidità, perdeva gradatamente la sua virulanza.

Egli vide che la terra di giardino appena raccolta uccideva per tetano 4 cavie su 4; dopo due mesi appena tre su sei e dopo altri pochi mesi tutte le altre cavie inoculate non ebbero più manifestazioni tetaniche.

Lo stesso fatto notò il Sormani con feci virulentissime di cane le quali conservate per un anno e reinoculate si dimostrarono indifferenti.

A questo punto credetti opportuno di studiare alcune condizioni d'ambiente, indispensabili per lo sviluppo del tetamo allo stato d'aereobiosi. Volli vedere cioè a quale temperatura detto microrganismo poteva svilupparsi ossia studiare quale rapporto aveva la luce solare su queste condizioni di sviluppo, stabilire infine, l'influenza che l'umidità aveva sulla vita del germe.

I metodi da me tenuti furono gli stessi già seguiti dal Sanfelice e da altri e perciò credo inutile ricordarli.

Riassumendo i risultati si nota che:

1) il bacillo di Nicolaier allo stato aerobico si sviluppa fra i 14° e 43° centig. Ritrova le migliori condizioni fra i 18°–39°;

2) la luce solare diretta ne impedisce lo sviluppo se essa agisce almeno per 24^h;

3) la luce solare diretta lascia in vita i germi (già sviluppatisi su terreni di nutrizione solidi e liquidi) per cinque o sei giorni. Trapiantati i germi in terreni nuovi e posti a 37° vegetano benissimo;

4) la luce diffusa lascia in vita il bacillo del tetano sviluppato in lastre aerobiche (45–50) giorni; al buio vivono bene anche dopo tre mesi;

5) sterilizzato del terreno, ed aggiunto ad esso delle culture in brodo di 48^h di tetano aerobico e delle patine raschiate dagli agar, si nota che i primi saggi resistono alla luce diffusa fino a 120 giorni, i secondi non resistono che 85. *La resistenza diminuisce col diminuire la quantità di sostanze nutritive;*

6) sterilizzato del terreno ed aggiunto ad esso un infuso di sostanze organiche (vegetali ed animali), macerate per 6 giorni in acqua a 37° e filtrate allo Chamberland, il bacillo del tetano aerobico mantenuto all'oscuro e seminato in questo terreno, resiste in vita fino al 110° giorno; se lo si espone alla luce diffusa muore dopo venti giorni ed alla luce solare diretta è già morto dopo 8–10 ore;

---

[1] Questi Annali, Vol. I, 1891, pag. 355.

7) seminato il bacillo del tetano allo stato aerobico su delle sostanze vegetali ed animali (foglia di cavolo, fieno, frutta fradice, ecc.) cotte e poi sterilizzate, vive bene su di esse per quattro mesi se mantenuto all'oscuro; per venti o venticinque giorni alla luce diffusa, per 14^h - 15^h alla luce solare.

Da questi risultati si comprende chiaramente che il bacillo del tetano divenuto aerobico, trova nell'ambiente molte condizioni per le quali presto s'esaurisce. Il suo ciclo di sviluppo si compie rapidamente; dal bacillo ritorna alla spora c da questa si ritorna al bacillo con una progressiva perdita di resistenza rispetto alla vita aerobica.

Il bacillo di Nicolaier adunque può trovare nell'ambiente tutte le condizioni adatte per compiere un intero ciclo evolutivo indipendentemente dall'assenza dell'ossigeno dell'aria.

Il bacillo del tetano non è nel terreno atossico ed aerobico; ma questa condizione di vita, sta in rapporto con fatti d'adattamento e inoltre esso si trova nell'ambiente esposto all'azione di molti agenti fisici (luce solare, ossigeno, ecc.) in modo che presto s'esaurisce. Appunto perciò riesce difficilissimo, se non impossibile isolarlo allo stato aerobico.

Stabilito che le colture di bacillo del tetano si potevano portare a vita scrobica, era importante studiare le condizioni che da questa conducevano il microrganismo a vivere anaerobicamente ed a produrre tossina.

Vaillard e Vincent, come ho già detto, trovarono che i terreni di coltura anche relativamente ossigenati, non si opponevano allo sviluppo del bacillo di Nicolaier nè toglievano ad esso il potere patogeno. Essi però sostennero che le colture anaerobiche corrispondevano meglio delle altre a mantenere le proprietà del germe,

È certo che l'opinione del Vaillard e del Vincent ha molto di vero e credo che in appoggio ad essa possa riferirsi anche il seguente fatto. Se noi prendiamo una vecchia coltura aerobica (di tre mesi) in essa le forme bacillari sono quasi scomparse, mentre rimangono a costituire la patina, un'infinità di spore libere. Seminate con queste colture alcune provette contenenti quantità di agar e di gelatina differenti in modo che, versate nelle capsule di Petri si abbiano degli strati di vario spessore. (da un sottile velo fino ad uno spessore di 10-12 mm), e posto su questi terreni solidificati uno strato d'olio d'oliva, si osserva che :

a) dove lo strato di terreno di coltura è sottile, non v'è mai sviluppo di colonie superficiali;

b) dove lo strato è alto, si hanno colonie superficiali, scarse le colonie profonde.

Ciò prova che anche la spora tetanica di per sè anaerobica ma tenuta in vita in presenza d'ossigeno, ha tendenza a germinare nei punti dove

d'ossigeno ce n'è poco, poichè essa avendo vissuto in contatto dell'aria per tanto tempo non può ad un tratto adattarsi a vivere là dove la quantità d'ossigeno è ridotta al minimo.

I tentativi fatti per riportare il bacillo del tetano dalla vita aerobica a quella anaerobica furono molteplici; ed è, senza dubbio più facile abituare il tetano, che per molti anni visse anaerobicamente, ai terreni di coltura ossigenati, che dalle colture aerobiche portarlo a quelle anaerobiche.

Se infatti, da una coltura in agar recente, si seminano dei tubi ad alto strato, non s' ottiene mai sviluppo. Lo stesso fatto avviene per le colture in gelatina ed in brodo.

Se noi invece lasciamo invecchiare in termostato delle colture aerobiche in agar (per quattro a cinque mesi) e cerchiamo di farle tornare anaerobiche, vedremo che ciò ci riuscirà senza troppe difficoltà. Gran parte delle piastre alle Buchner dànno risultato positivo, e lo stesso avviene per buon numero delle colture ad alto strato.

Ciò prova ancora che, essendo le vecchie colture aerobiche composte quasi essenzialmente di spore, la spora tetanica è se non assolutamente certo relativamente anaerobica.

È da notarsi che, se noi preleviamo il materiale d'innesto da vecchie colture in brodo tenute all'oscuro (quattro cinque mesi), non si ottiene quasi mai sviluppo nei substrati anaerobici, mentre la vita continua sui nuovi trapianti aerobici.

Fin d'ora poi posso dire che le colture aerobiche col tornare anaerobiche non riprendono il potere di dare tetano tossina.

Se facciamo vivere il tetano aerobico, sui prodotti di altri bacteri esso ritorna facilmente anaerobico e tossico? Seguii la stessa via che mi servì per portarlo da vita anaerobica a quella aerobica. Dai risultati della tabella si vede che occorre un tempo lunghissimo perchè s'effettui il ritorno alla vita anaerobica e che questo precede di molto la comparsa della tossicità. Apparisce chiaramente che le colture aerobiche per il solo fatto di ritornare anaerobiche non riprendono il potere di dare tetano tossina, ma che la comparsa dell'anaerobiosi precede la comparsa della tossicità.

Adunque l'anaerobiosi è condizione indispensabile perchè il bacillo di Nicolaier sia tossico, essa però non è condizione sufficiente.

COLTURE aerobiche	VITA su prodotti bacterici	TENTATIVI di coltura anaer.	INOCULAZIONI negli animali
24^h	24^h	negativo	nulla
48^h	48^h	»	»
5 giorni	5 giorni	»	»
10 »	10 »	»	»
15 »	15 »	»	»
20 »	20 »	»	»
30 »	30 »	»	»
40 »	40 »	»	»
60 »	60 »	»	»
80 »	80 »	sviluppo assai rachitico	»
120 «	120 »	positivo	»
140 »	140 »	»	»
160 »	160 »	»	tetano *
180 »	180 »	»	»

* Le contratture sono assai localizzate (arti posteriori) non gravi e compaiono tardivamente.

La facilità con cui il bacillo del tetano vive sui propri prodotti atossici e sui prodotti di comuni saprogeni, é una nuova conferma a quanto già il Tizzoni aveva detto, che cioè, la simbiosi con altri bacteri era necessaria, se non per conferire, almeno per esaltare la virulenza del bacillo del tetano.

Il Grixoni dà al bacterium coli una speciale importanza considerando la simbiosi di esso col bacillo di Nicolaier come uno dei principali fattori atti a conferirgli la virulenza. A priori si può dire che, considerando la diffusione del bact. coli, l'osservazione del Grixoni non deve essere del tutto esatta. Se al coli bacillo stesse legato questo potere non ci potremmo spiegare come la tossicità del bacillo di Nicolaier nel mondo esterno ed in buone condizioni d'ambiente si può esaurire.

Ho ripreso queste esperienze per vedere se il tetano ritornato anaerobico poteva per questa simbiosi fabbricare nuovamente tossina.

Sperimentai su tre colture di bacterium coli di virulenza differente. Riferisco in breve la dose minima letale di ciascuna coltura in brodo dell'età di quattro giorni:

Bact. coli (A) = $^1/_{50}$ di cc. uccide una cavia del peso (M $^{250-300}$) in 24^h;

Bact. coli (B) = $^1/_{20}$ di cc. uccide una cavia del peso (M $^{250-300}$) in 48^h - 3 giorni;

Bact coli (C) = 2 cc. uccidono una cavia del peso (M $^{250-300}$) in cinque giorni.

Seminate queste colture con bacilli del tetano aerobici e giovani, non ottenni altro risultato che quello di fare aumentare il potere patogeno del bact. coli C. Le cavie invece di morire in cinque giorni per l'inoculazione di 2 cc. di coltura, morivano in 48^h - 50^h inoculando un centimetro cubo della miscela.

È da notarsi che tutte le cavie, poche ore prima della morte, presentavano convulsioni con movimenti di natazione dei quattro arti, e sussulti tendinei: *nessuna cavia ebbe mai contratture nè agli arti, nè ai muscoli della regione dorsale.* Questi fatti convulsivi non hanno nulla a che fare con le contratture che si osservano iniettando tetano tossina; essi si hanno anche in seguito a semplici iniezioni di dosi mortali di bact. coli. Inoculando la tetano tossina negli animali di laboratorio, i primi fatti a comparire sono le contratture, e solo nel periodo preagonico si manifestano dei fatti convulsivi di durata brevissima; queste convulsioni scompaiono nel periodo agonico, quando la forma di paralisi spastica, cede il posto alla paralisi flaccida, ch'è seguita immediatamente da morte.

Gli stessi risultati negativi s'ottengono se noi innestiamo il bacillo del tetano aerobico sui filtrati di colture di bact. coli o sulle colture di detto microrganismo sterilizzate al calore. Se invece di colture giovani, noi seminiamo su questi prodotti del bact. coli vecchie colture di tetano aerobico (quattro-cinque mesi), si riesce con facilità a riottenerlo anaerobico, ma la comparsa della tossicità non si ha che raramente e quando le nuove colture anaerobiche vivono come tali per vario tempo.

Il bact. coli non presenta per la simbiosi col bacillo del tetano atossico nessun fatto importante: esso, benchè dotato di grande virulenza spiega la medesima azione dei comuni saprofiti.

È difficile che nell'ambiente si possano verificare quelle condizioni per le quali il bacillo del tetano atossico, possa riprendere la propria tossicità. È quasi impossibile che nel terreno la spora possa vivere per lungo tempo ad una temperatura di 35°–37° al riparo della luce e dell'ossigeno in modo da avere anaerobiosi ed in seguito la facoltà di dare tossina.

L'intestino degli animali, specie degli erbivori, può soltantò crearci condizioni analoghe a quelle di laboratorio: in essi esiste il bact. coli associato a molti soprofiti, nell'intestino non c'è nè luce, nè ossigeno

ed inoltre la temperatura è costante. Gli erbivori poi sono animali che si trovano in contatto con quei luoghi dai quali più spesso si isola il bacillo di Nicolaier.

Dalle ricerche del Verneuil [1] e del Sormani [2] che valsero a fondare la teoria equina dell'uno, e quella fecale dell'altro, ci è noto che il bacillo del tetano si trova quasi costantemente nell'intestino di questi animali.

Occorreva, perciò. di poter disporre di animali nel cui intestino non esistesse il bacillo del tetano, o dai quali si potesse senza troppe difficoltà eliminare.

Non mi fu possibile di potermi liberare del bacillo del tetano contenuto nelle feci delle cavie, poichè l'alimentazione con sostanze vegetali sterilizzate non era bene sopportata da esse: dopo 10-12 giorni morivano con grave marasmo.

Scelsi invece 4 sorci decumani albini che nutrii per due mesi con del pane essiccato alla stufa (50°) e con acqua sterilizzata. Decorso questo tempo ogni otto o dieci giorni raccoglievo le feci su di una lastra di vetro sterilizzata e dopo averle essiccate e frantumate le esponevo per tre giorni in ambiente confinato, ai vapori di cloroformio. Ciò feci per liberarmi dagli altri germi (specie dal bact. coli) che avrebbero potuto uccidere gli animali da esperimento per setticoemia. Inoculando con le feci trattate in tal modo, delle cavie m'accorsi fino dai primi saggi che il bacillo di Nicolaier non esisteva in esse. Fatte le colture per gli anaerobi ottenni gli stessi risultati negativi.

Cominciai allora ad unire al pane, le colture di tetano aerobiche. Dopo 24h cominciai a ricercare il bacillo del tetano nelle feci sia coi mezzi colturali, che con le inoculazioni negli animali.

Riassumo nella seguente tabella i risultati avuti:

---

[1] *Gaz-hebd*, settem 1886. - *Congresso di chirurgia*, ott. 1886. - *Revue de chir.*, 1887-1888.

[2] Central. f. Bakt. Bd. IX, 1891, n. 12-17; *Verhandlungen des X Intern. Med. Congr. Berl.*, 1891. - Questi Annali, vol. I, 1891; (Serie nuova) pag. 355.

TEMPO di alimentazione coi bacilli tetanici aer	COLTURE ANAEROBICHE	INOCULAZIONE negli animali
24h *	negative	negative
36h	»	»
48h	»	»
3 giorni	»	»
4 »	»	»
5 »	»	»
8 »	»	»
10 »	»	»
12 »	»	»
20 »	sviluppo	»
25 »	»	»
26 »	»	»
30 »	»	positive
35 »	»	»
40 »	»	»

* Le quantità di colture in brodo ingerite dai sorci furono complessivamente di 580 cc.

Da ciò si vede che il bacillo del tetano e la spora atossica rimangono un certo tempo nell'intestino prima di poter tornare anaerobici e tossici.

Per quale ragione nell'intestino degli animali avvenga più presto questo ritorno alla vita anaerobica e tossica del bacillo di Nicolaier, non lo saprei spiegare. Forse l'attività delle cellule della mucosa vivente insieme coi prodotti di ricambio dell'organismo, potranno creare condizioni tali che noi non riusciamo a riprodurre in laboratorio.

Un'ultima ricerca volli fare sull'argomento.

Già il Sanfelice[1] aveva dimostrato che il pseudobacillo del tetano, non differenziabile dal vero tetano che per la mancanza del potere patogeno, dopo che ha vegetato sulla tetano-tossina, acquista potere tossico. Volli vedere se il bacillo del tetano aerobico si comportava come il pseudobacillo del tetano, ed avrei anche in tal modo potuto confermare indirettamente l'ipotesi del Sanfelice, ossia che il pseudo-bacillo

[1] Questi Annali, vol I, fasc IV, 1892.

del tetano altro non fosse che un vero bacillo del tetano attenuato straordinariamente.

Innestai su dei brodi contenenti tetano-tossina tanto il bacillo del tetano aerobico quanto quello riportato a vita anaerobica ma sempre atossico. Ciò feci con lo scopo di vedere se questi bacilli fossero capaci di scomporre la tetano-tossina, e se, rimanendo per vario tempo in contatto con essa, potessero prenderne una certa quantità sufficiente a mantenere tossici ed anaerobici i bacilli, attraverso i successivi trapianti.

A questo punto credo opportuno di riferire il valore tossico dei prodotti dei miei bacilli del tetano. Per paragonare meglio i dosaggi e per potere con maggior facilità impiegarla quale mezzo di coltura, preferii preparare la tossina con colture in brodo. Il metodo ch'io tenni fu quello proposto da Vaillard e Vincent, ossia dopo un certo periodo di sviluppo (10-12 giorni) del bacillo di Nicolaier in brodo, in cui avevo fatto gorgogliare dell'idrogeno, innestavo colture nuove e tossiche, aggiungendo un po' di brodo fresco. La tossina che si ottiene è potentissima; però nelle varie manovre, avvengono spesso degli inquinamenti. Filtrati questi brodi (dopo 30-35 giorni) attraverso candele Berkefeld, e seccati i filtrati esponendoli in sottili strati sotto degli essicatori a cloruro di calcio e nel vuoto, si ha, dopo tre o quattro giorni, la tossina impura allo stato secco

Un milligrammo di questa tossina dà tetano in una cavia ($M.^{250-300}$) dopo un periodo d'incubazione di 36^h circa. Alle contratture, dopo $14\text{-}15^h$, tien dietro la morte.

Presi 5 cc. di questi brodi tossici filtrati e seminati su di essi il bacillo di Nicolaier aerobico e quello tornato anaerobico, furono posti in termostato (37°). Ebbi cura di lasciare in termostato anche dei brodi tossici non innestati, allo scopo di poter stabilire il momento in cui la tetano-tossina, per effetto del calore e dell'auto-idratazione, si sarebbe esaurita.

Iniettando progressivamente ogni 24^h un centimetro cubico di questi brodi in varie cavie, si osserva che mentre i brodi tossici sui quali si semina il bacillo del tetano aerobico, dànno presto (dopo 36^h) le contratture su molti gruppi muscolari degli arti e del dorso, i brodi tossici semplici, invece, dopo sette giorni di termostato, non producono più tetano. Le colture fatte sui filtrati tossici dànno ancora il tetano fino al dodicesimo o tredicesimo giorno; dopo questo tempo non si ottengono più contratture. Questo fatto sta certamente in rapporto con l'azione attenuante dell'aria che filtra attraverso il tappo d'ovatta.

Se facciamo vivere per sei giorni in queste condizioni il bacillo di Nicolaier aerobico e lo innestiamo su dei tubi di coltura ad alto strato

alla Liborius, vediamo dopo cinque o sette giorni di stufa uno sviluppo abbastanza rigoglioso lungo la puntata. Questo bacillo, che si è riadattato al proprio ambiente, è patogeno per i sorci e per le cavie, dando in essi le caratteristiche contratture.

Dapprima credetti che la spora tetanica priva di tossina, messa in contatto con la tetano–tossina se ne impossessasse, e che essa, avida della propria tossina, la perdesse solo quando le condizioni d'ambiente erano capaci di trasformarla.

Filtrando, una coltura di tetano atossica vissuta su prodotti tossici attraverso lo Chamberland, ed iniettando i filtrati, osserveremo che questi filtrati hanno perduto già, dopo cinque o sei giorni di stufa ogni potere tossico. La perdita della tossicità avviene cioè molto più presto che non nelle colture esposte alla temperatura di 37°. Ciò prova che gran parte della tetano-tossina si è fermata sui corpi bacillari e sulle spore, ma non prova ch'essa sia stata incorporata o dalla spora o dal bacillo.

Infatti, nei successivi trapianti di questo bacillo del tetano ritornato anaerobico (3°–4° passaggio su tubi alla Liborius) si osserva che mentre i bacilli sviluppatisi sulla puntata si mantengono tossici, i pezzi d'agar lontani dal tramite d'infissione inoculati in borse sottocutanee non dànno mai tetano.

La tetano-tossina, adunque, non torna a far parte o della spora o del bacillo, ma semplicemente forma attorno ad esso come una vernice tossica della quale si spoglia coi ripetuti trapianti su terreni nuovi (6°-7° trapianto), pur vivendo sempre anaerobicamente.

Sorge ora naturale il domandarci se questa proprietà di spalmarsi di tetano-tossina è soltanto del bacillo del tetano aerobico o se anche altri germi diffusi nell'ambiente si comportino nello stesso modo. A tale uopo feci alcune ricerche con due germi comunissimi: il bac. coli e il bac. radiciforme.

Del valore patogeno del bact. coli ne ho già parlato. Ricorderò soltanto che per queste ultime ricerche impiegai il bact. coli B.

Feci vivere tanto il b. radiciforme quanto il colibacillo sul filtrato in brodo ricco di tetano-tossina, e dopo tre giorni di sviluppo inoculai sotto la cute delle cavie dosi differenti di queste colture.

Dal protocollo di laboratorio risulta che:

1° 1/20 di cc. di coltura uccide una cavia (M. $^{250\text{-}300}$) per setticoemia da bact. coli in 3-4 giorni, senza dare nè contratture nè paralisi.

2° 1 cc. di coltura uccide una cavia (M $^{250\text{-}300}$) in 48^h circa, dando dopo 36^h contratture localizzate agli arti ed ai muscoli del lato su cui fu praticata l'inoculazione;

3° filtrando una cultura di bacillo radiciforme fatta su brodo con tetano-tossina attraverso la carta ed iniettando ciò che è rimasto sul filtro, si ottengono dopo tre giorni le contratture e la morte per tetano dell'animale;

4° uccidendo con cloroformio il bact. coli contenuto in queste colture e filtrando attraverso candele Berkefeld inoculando i corpi bacillari morti rimasti sul filtro, si manifesta il tetano negli animali.

Se noi poi facciamo dei passaggi in tubi per le colture degli anaerobi ad alto strato, tanto del bac. coli quanto del bacillo radiciforme, vissuti sulla tetano-tossina, il bact. coli si sviluppa bene, mentre il b. radiciforme dà uno sviluppo scarso o nullo. Ora tanto l'uno quanto l'altro si spogliano ben presto della tetano-tossina, e già al secondo passaggio sui terreni anaerobici e aerobici non si manifestano più contratture.

Risulta chiaramente che il b. coli ed il b. radiciforme non si appropriano la tetano-tossina, ma che, allo stesso modo del b. del tetano aerobico, si forma attorno ad essi una patina tossica della quale si privano senza troppe difficoltà.

Tentativi di vaccinazione.

In appendice a queste esperienze sulla morfologia e sulla biologia del bacillo di Nicolaier, riferirò i risultati di altre ricerche che ho istituito da parecchio tempo, ma che per l'indole dell'argomento, si trovano ancora all'inizio. Voglio parlare di alcuni tentativi di vaccinazione.

Appena mi accorsi che le colture aerobiche erano atossiche, pensai di vedere se esse avessero un potere vaccinante per gli animali suscettibili al veleno del tetano.

Le prove fatte di vaccinazione sommano a 48, e furono eseguite su cavie del peso di 250 a 400 grammi.

Dapprima iniettai in esse colture aerobiche in brodo di 48^{h} uccise con cloroformio: cominciai con le iniezioni di mezzo centimetro cubico di dette culture, e giunsi ad iniettarne fino a 70 cc. senza che le cavie dessero segno di tetano. Le cavie però morivano per lento e progressivo marasmo, tanto che in esse si notò la perdita del 30-32 per cento del loro peso.

Nelle colture in brodo le sostunze marantiche avevano il predominio sulle sostanze vaccinanti, se pur queste, in esse esistevano.

che queste colture atossiche in brodo, anzichè avere un potere vaccinante, rendevano le cavie più sensibili al veleno del tetano. Se per uc-

cidere una cavia nuova ($M^{250-400}$), occorreva una dose di 1/1000 di cc. di tetano-tossina, per avere la morte delle cavie trattate con le colture aerobiche in brodo bastavano dosi minori (1/2000 e 1/5000 di cc).

Nelle colture in brodo le sostanze marantiche avevano il predominio sulle sostanze vaccinanti, se in esse esistevano.

Mi rivolsi invece alle culture in agar aerobiche. Raschiate molte patine di colture fatte su capsule di Petri, le misi ad essicare alla temperatura di 50°; appena secche le uccisi esponendole ai vapori di cloroformio in ambiente confinato. Ottenuti questi corpi bacillari morti e secchi, ne pesai una certa quantità (1 centigr.), che, emulsionato in una soluzione fisiologica d'acqua salata, inoculai nelle cavie. Le cavie tollerarono benissimo queste iniezioni senza dar segni nè di dimagramento nè di fatti convulsivi. Giunsi in tal modo ad iniettarne fino a venticinque centigrammi e contemporaneamente inoculai la dose minima mortale di tossina (1/1000 di cc.). La cavia di controllo morì di tetano dopo 50^h ; di quelle vaccinate rimasero in vita: la prima per 6 giorni, dopo i quali si manifestò una contrattura all'arto posteriore sinistro; la seconda visse per 10 giorni, ed anch'essa ebbe tetano; e l'ultima visse un po' abbattuta e solo dopo cinque giorni ebbe le contratture che però furono lievi e localizzate tanto che la cavia visse per dodici giorni ancora.

Risulta da questi esperimenti grezzi che nelle culture aerobiche esistono delle sostanze vaccinanti, e la difficoltà di poterle ricavare e trarne da esse profitto, sta principalmente nello stabilire la quantità di sostanza vaccinante capace di neutralizzare una data quantità di virus tetanico.

In un'altra serie di esperimenti, dopo avere iniettato nelle cavie fino a 35 centigr. di bacilli del tetano atossici e morti, inoculai due centigrammi di coltura in agar anaerobica e tossica di tetano, cercando che la parte iniettata in una borsa dorsale fosse essenzialmente costituita dallo sviluppo dei bacteri lungo il tramite dell'infissione; cercai cioè d'inoculare bacilli tetanigeni con poca tossina preformata. Le cavie di controllo morirono in 48^h con grave pleurostotono; di quelle in cui avevo tentato la vaccinazione una rimase in vita per sei giorni, un'altra ne visse otto, ed ambedue morirono con lievi contratture; altre due cavie alle quali avevo continuato ad iniettare bacilli aerobici (fino ad 1 gr. e 60 centigr. di patina secca), morirono fra la ventunesima e la trentesima giornata senza che io potessi precisare la causa della morte e senza che le contratture si manifestassero.

Riassumendo adunque queste prime ricerche dalle quali però non si possono trarre conclusioni definitive, si può dedurre intanto che:

1. nelle colture di tetano aerobico esistono sostanze marantiche e sostanze predisponenti;

2. i bacilli atossici uccisi e disseccati contengono probabilmente sostanze vaccinanti.

CONCLUSIONI GENERALI.

1. Il bacillo del tetano, abituato a vivere anaerobicamente, si può sempre adattare a vita aerobica.

2. Se il bacillo del tetano primitivamente anaerobico era anche tossico, perde la propria tossicità, diventando aerobico.

3. Non si riesce ad isolare direttamente dal terreno allo stato aerobico il bacillo del tetano: questo fatto è legato all'azione combinata dagli agenti esterni (luce solare, aria, temperatura) che uccidono presto il bacillo aerobico del tetano.

4. Il passaggio dalla vita anaerobica a quella aerobica si ottiene con maggiore facilità che non l'adattamento dalla aerobiosi alla anaerobiosi.

5. Per il passaggio dalla vita aerobica a quella anaerobica sono indispensabili le seguenti condizioni:

a) invecchiamento delle colture aerobiche sui propri prodotti;

b) azione dei prodotti di comuni saprofiti;

c) simbiosi coi comuni saprogeni.

In tutti e tre i casi occorre l'azione della temperatura favorevole.

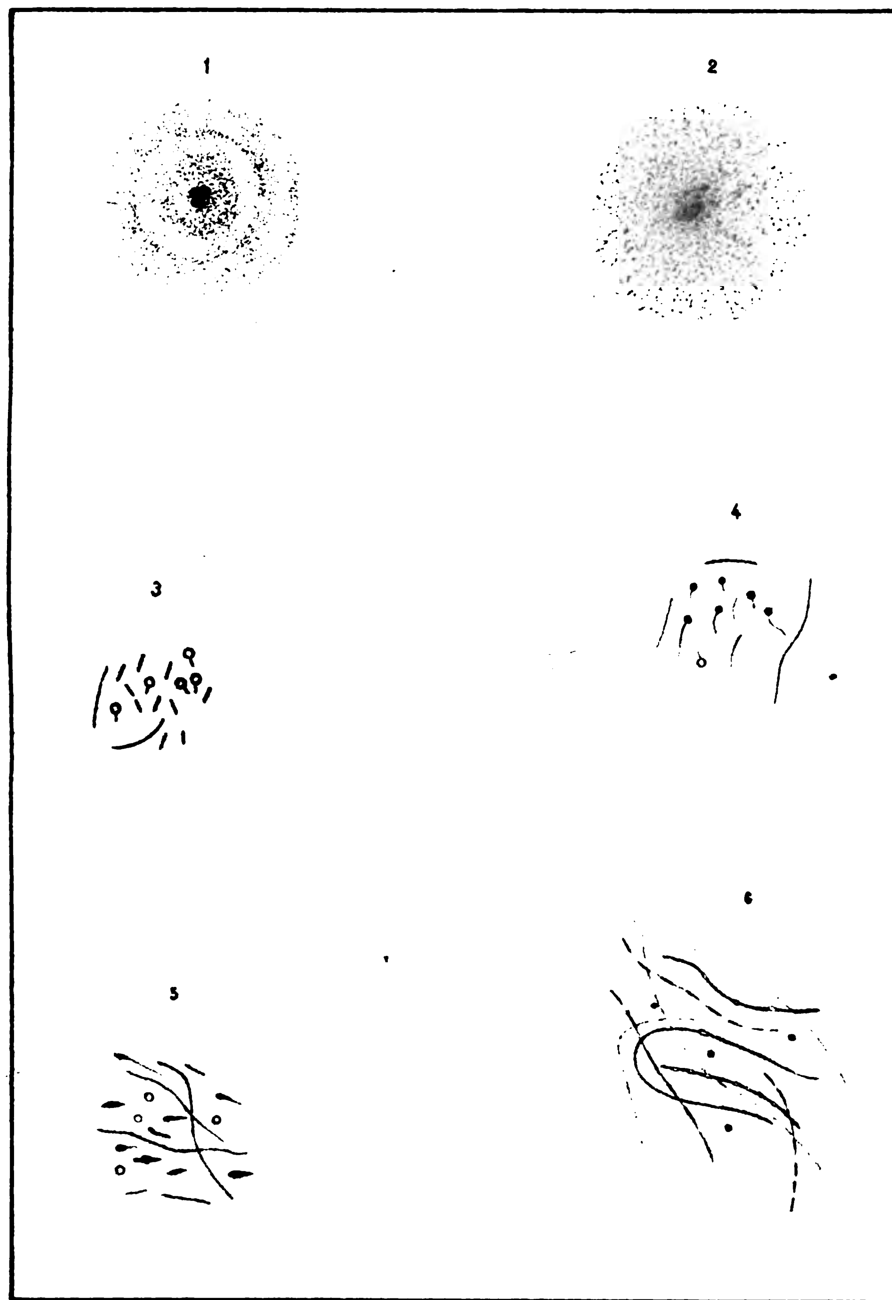
6. Cercando di trasportare bruscamente il bacillo o la spora del tetano da terreno colturale anaerobico a quello aerobico e viceversa, le colture rimangono sterili.

7. L'anaerobiosi è una condizione necessaria perchè si produca tetano-tossina.

8. Il bacillo del tetano passato dalla vita anaerobica a quella aerobica, e così perduta la tossicità, ridiventando anaerobico, perchè riacquisti la proprietà di dare tossina, deve trovarsi in condizioni di vita speciali, cioè:

a) deve vivere per lungo tempo sui propri prodotti atossici o insieme con altri germi saprogeni o coi loro prodotti a temperatura costante, all'oscuro e fuori del contatto diretto dell'aria; oppure

b) deve vivere colla tossina normale del bacillo di Nicolaier a temperatura costante, all'oscuro, e fuori del contatto dell'aria. Però questa tossicità è transitoria.



VALAGUSSA DIS E. BATTISTI LIT. - ROMA

9. Le condizioni dette in *a*) si avverano in natura nel miglior modo nell'intestino degli animali.

Da queste ricerche riusciamo a spiegarci abbastanza bene come malgrado l'enorme diffusione del bacillo di Nicolaier i casi di tetano siano relativamente rari.

In natura esso trova un cumulo di condizioni che valgono più ad attenuarne che a mantenerne la tossicità. La spora tetanica rimasta nell'ambiente, insieme ai prodotti di altri batteri, può trasformarsi in bacillo aerobico il quale a sua volta sporifica fino a che il terreno di nutrizione non si esaurisce, rimanendo in tal caso la sola spora attiva che è anaerobica. Gli animali mangiano con l'erba queste spore, e nell'intestino di essi, per l'azione combinata dell'associazione microbica e della temperatura, riprendono il potere di dare tossina. Cadute le spore di nuovo con le feci nel terreno e vegetando sulle sostanze organiche e sui prodotti d'altri microbi, si adattano a compiere il loro ciclo di vita aerobico ed atossico.

Anche l'importanza della teoria fecale del tetano apparisce in modo evidente, e con essa si spiega come il bacillo del tetano possa trovarsi atossico nell'ambiente, mentre a sua volta l'intestino degli animali racchiude quelle condizioni di temperatura, d'anaerobiosi, di simbiosi con altri germi le quali sono indispensabili per conferire alla spora tetanica la tossicità perduta. Non dobbiamo con questo trascurare altre circostanze che si possono trovare in ogni ferita, per le quali la spora tetanica, sia per il maltrattamento dei tessuti, sia per la profondità della ferita e per la simbiosi coi comuni saprofiti, può essere posta in condizioni analoghe a quelle che si riscontrano nell'intestino.

Spiegazione della tavola.

(Tav. V).

1. Coltura a piatto in agar - obb. 2 - ocul. 2.
2. Coltura a piatto in gelatina - obb. 2 - ocul. 2.
3. Preparato colorato (imm. omog. 1|15) dopo 24h di sviluppo del bacillo del tetano in terreno nutritivo aerobico.
4. Preparato colorato (imm. omog. 1|15 ocul. 3) dopo 4 giorni di sviluppo, ecc. ecc.
5. Preparato colorato (imm. omog. 1|15 ocul. 3) dopo 7 giorni di sviluppo, ecc. ecc.
6. Preparato colorato (imm. omog. 1|15 ocul. 3) dopo 12 giorni di sviluppo, ecc.

Istituto d'Igiene sperimentale dell'Università di Palermo

L'INFLUENZA DEI SALI MINERALI SULLA TERMOGENESI ANIMALE

RICERCHE CALORIMETRICHE

DEI DOTTORI

A. INSINNA e G. DOLCE

DESCRIZIONE DEL CALORIMETRO AD ARIA DI RUBNER
E MODO DI USARLO

PEL

Dott. A. INSINNA
Assistente

Nel 1851 Liebig, pel primo, nelle sue *Lettere sulla chimica*, con intuito geniale, mette in rilievo il compito molto importante dei principî minerali nell' alimentazione, sino ad affermare, che, assente il materiale salino, diveniva impossibile la digestione medesima degli alimenti organici e la ricostituzione dei tessuti e degli organi, usurati pei processi biologici attivi degli elementi cellulari.

Dal 1851 non pochi scienziati hanno voluto dare la conferma positiva all' idea emessa dall' illustre chimico, studiando in mille modi e da molti punti di vista quale importanza ai sali inorganici spetti nella vita animale.

In tutti questi studi, però, che sinora non hanno risolutamente sviscerato: perchè e quanto sia necessario lo scambio degli alimenti salini; quali fra tanti siano strettamente necessari; quale di ognuno sia la razione sufficiente; e quale sarebbe il compito o la destinazione di ciascun sale organico; si è guardato da un solo lato la questione, si è voluto cioè soltanto ricercare la parte che a tutti in massa o ad ognuno dei sali minerali degli alimenti più comuni spetta nel ricambio materiale.

Ma quando si riflette che è da tempo notorio, come i nostri alimenti

rispondono a due ordini di bisogni: apporto di sostanze chimiche determinate, necessarie per la reintegrazione ed il mantenimento dei tessuti animali, ed apporto di una somma di energia sufficiente a sostenere il lavoro meccanico e riparare la perdita di calorie nell'organismo, si è maravigliati come sino a pochi anni fa non si fosse ancora ricer cato, se, come e quanto intervenissero i sali nello scambio delle forze.

Sino a tempo addietro si pensò generalmente, senza alcuna prova diretta, che i sali non partecipassero alla produzione del calore che incessantemente si ha nell' organismo per i molteplici fenomeni chimici (ossidazione, idratazione, sdoppiamento, disidratazione, sintesi e riduzione), i quali si svolgono in seno agli elementi cellulari.

È in seguito ai lavori del prof. van t' Hoff,[1] che è stato scosso il dogma fisiologico, che all'organismo animale la debita misura di energia sia fornita solo dalle tre sostanze alimentari: *albuminoidi*, *grassi* e *idrati di carbonio.*

Basandosi sui nuovi principî di fisica-chimica, van t' Hoff ha lanciato al mondo scientifico la nuova teoria che anche i sali offrono al corpo animale fonti considerevoli di energia, di cui è possibile misurare la grandezza.

Questa energia che la soluzione dei sali nell' organismo produrrebbe sotto date condizioni, sarebbe dovuta a fenomeni di pressione osmotica o movimento, misurabili in pressione atmosferica e sarebbe utiliz zata per il *riassorbimento e il lavorio metabolico dei principî alimentari.*

Secondo la *teoria della dissociazione elettrolitica* di Arrhenius, nella soluzione di un elettrolito (alla cui classe appartengono i sali inorganici) nell' acqua avviene una parziale scissione dello stesso nei suo joni.

Per es. nella soluzione di cloruro di sodio nell' acqua una parte delle molecole NaCl si scinde nei suoi joni: l'jono Na e l' iono Cl.

Una soluzione di sale di cucina contiene quindi tre molecole: molecole NaCl neutre e joni Na e Cl liberi.

Dal numero delle molecole esistenti nella soluzione dipende la grandezza della pressione osmotica della soluzione; per la dissociazione il numero delle molecole viene ingrossato e con ciò anche la pressione osmotica della soluzione.

Mossi da queste nuove vedute riguardo all' importanza dei sali inorganici nel corpo animale, ci siamo domandati se il compito di tali sali

---

[1] Vedi Hans Koeppe, *Die Bedeutung der Salze*, ecc., J. Ricker' sche-Buchandlung, Giessen, 1896.

nello scambio delle forze, posato quasi teoricamente, non fosse limitato a sole manifestazioni di pressione o movimento, ma si estendesse anche alla produzione di una maggior quantità di calore; in altre parole se i principî minerali entro l' organismo non spiegassero una influenza più o meno grande, sia diretta o indiretta, sulla produzione di calore.

Se ad un animale si somministra per un dato tempo una data razione diurna priva di sali inorganici ed in seguito per un egual tempo si somministra la stessa razione e per dippiù gli si fa ingerire una copia adatta di sali alcune ore dopo il pasto (ciò allo scopo di prevenire qualsiasi azione favorevole all' assimilabilità dell' alimento e far sì che la quantità di principî organici assorbiti fosse identica nei due tempi), quale sarà la perdita giornaliera di calore da parte dell'animale nei due periodi, dato che si mantengano costanti le influenze su esso di temperatura, di pressione, di umidità atmosferica?

È su questo indirizzo che noi abbiamo iniziato le nostre ricerche calorimetriche.

Per ragioni di tecnica, così come per incompatibilità da parte dell' animale all' enunciato metodo ideale di vittitazione, abbiamo dovuto modificare il piano degli esperimenti, pur tenendo fermo all' obbiettivo da cui siamo partiti.

Una prima difficoltà che ci si presentò per potere imprendere il tipo ideale di esperimento fu l' impossibità di preparare un cibo privo del tutto di sali.

Ci dovemmo contentare del riso e della carne bolliti, che si possono liberare con questo modo di cottura della maggior parte dei minerali [1].

Si prepararono kg. 2 di carne e altrettanto di riso.

La carne tritata, quindi bollita in acqua distillata, poi messa in un cola brodo, infine compressa in uno strettoio per privarla dell'acqua e dei sali fu distribuita in porzioni eguali in 20 bottiglie.

Il riso bollito e liberato con uno stacciatore della gran parte dell'acqua, fu pure distribuito nelle 20 bottiglie, le quali furono infine sterilizzate nell' autoclave.

Ogni giorno in una di queste bottiglie si versava una data quantità di acqua distillata e dopo avere scaldato il tutto in un bagno-maria, il contenuto si versava in un tegamino e si apprestava all' animale alle ore 17 di ogni giorno.

Il cane era stato assuefatto sia alla razione di carne e riso come al metodo di un unico pasto giornaliero.

Nel frattempo che si esperimentava sul cane, alimentato con cibo demineralizzato, si evaporava a secco e quindi si calcinava metà del brodo

---

[1] Vedi *Aliments* in Diction. de Physiol. par Ch. Richet, pag. 826.

ricavato dal lesso della carne e del riso. Un decimo di queste ceneri, addizionate di sale di cucina nella proporzione di gr. 0,5 per chilogramma di peso dell'animale, furono nel 2° periodo d'esperimento somministrate ogni giorno al cane per la via gastrica mercè una sonda esofagea.

Dobbiamo avvertire peró che le ceneri non si scioglievano tutte, sicchè una parte era ingerita allo stato di sospensione, e che la somministrazione era fatta alle ore 10, cioè 17 ore dopo del pasto del giorno precedente e 7 ore prima del pasto successivo.

Intanto al 14° giorno d'esperienza il cane non volle mangiare che poco della razione e al 15° non volle mangiarne affatto.

Ed allora visto che l'animale rifiutava il cibo, il quale a dire il vero non era punto modificato nell'odore e nell'aspetto, visto che aveva già perduto la vivacità molto spiccata in lui, si pensò di alimentarlo con carne e riso, bolliti poco prima del pasto e addizionati con sale, sino a che migliorò nel peso e riprese lo spirito primitivo.

Il 30 aprile 1898, nove giorni dopo cioè della prima esperienza si cominció la 2ª, proponendoci di rendere più breve il 1° periodo, e nel 2° periodo di somministrare una soluzione di sali preparata in base al contenuto minerale medio di un litro di brodo, ottenuto con gr. 400 di carne (contenuto minerale che trovasi riferito nella *Chimie biologique* di A. Gautier, 1892, tom. III, pag. 302).

Anche questa volta si prepararono prima le razioni alimentari giornaliere.

Ma anche questa volta il cane al 2° giorno del 2° periodo si rifiutò di prender cibo.

Dopo di ciò si dovè modificare il sistema di vittitazione; si dovè cioè abbandonare lo studio dell'influenza di tutti i sali sulla termogenesi animale e limitare a studiare quella del solo sale di cucina; si dovè inoltre rendere brevi i due periodi dell'esperienza, nella speranza di potere ottenere dei risultati non meno attendibili che quelli forniti da un lungo esperimento.

Pel cane adoperato nelle precedenti esperienze, si preparò un chilogramma di carne, che fatta in pezzi piccolissimi fu distribuita in porzioni eguali in 10 bottiglie e sterilizzata.

Uno stesso peso di riso fu diviso in 10 porzioni uguali ed ogni giorno la porzione di carne e di riso giornaliera era bollita insieme, in una data quantità di acqua di fonte, e somministrata alle ore 17 di ogni giorno.

Nel 2° periodo il sale di cucina veniva dato in soluzione per la via gastrica alle ore 11 di ogni giorno e nella proporzione di 0.50 per Kgr. dell'animale. Allo stesso modo abbiamo condotto l'esperimento in un secondo cane di taglia più piccola del primo. La quantità del cibo però, così come l'orario del pasto, differiscono. Di carne e riso se ne preparò per i 10 giorni gr. 800 rispettivamente. L'alimento si dava ogni giorno alle ore 18, e il sale nel 2° periodo era somministrato alle ore 7.

Durante tutto il tempo dell'esperienza i due cani non bevvero acqua;

il bisogno di acqua era soddisfatto da quella che si somministrava loro col cibo solido.

Non avendo a nostra disposizione l'ultimo calorimetro di Rubner descritto nell'opuscolo « *Calorimetrische Methodik*, Marburg, 1895 » e nella *Zeitsch f. Biologie*, 1898, Vol. XXX, pag. 91, il quale calorimetro essendo provvisto di apparecchi grafici, permette di seguire senza una permanente assistenza le perdite di calore dell'animale di ora in ora lungo notti e giorni, le ricerche calorimetriche furono fatte col primo calorimetro, che Rubner ha adoperato nei suoi classici lavori sulla calorimetria animale e che descrive dettagliatamente nella *Zeitschrift für Biologie*, Vol. XV, 1889 a pag. 400, sotto il titolo « *Ein Calorimeter f. physiolog. u. hygien. Zwecke* ». Quest'altro calorimetro vuole essere seguito assiduamente e quindi ci siamo dovuti limitare a sapere solo la quantità di calorie emesse in determinate ore della giornata.

Pertanto abbiamo avuto cura che la ricerca calorimetrica decorresse ogni giorno ad uguale distanza dalla somministrazione del pasto nel 1° periodo, dalla somministrazione del pasto e dei sali nel 2° periodo.

Come appendice al nostro lavoro uno di noi riferirà dettagliatamente sul detto calorimetro, sia perchè la conoscenza di esso sia nel nostro paese più diffusa di quel che non è oggi, sia perchè si é dovuto apportare allo istrumento qualche modifica che ne rende più spedito l'uso, più sicuri i risultati.

Oltre alla raccolta dei dati calorimetrici si volle fare anche quella della urina, per controllare l'andamento di una parte del ricambio materiale.

L'urina che si computava a ciascun pasto era quella che il cane emetteva in 24 ore, 12 ore dopo il pasto. Della quantità giornaliera $^1/_{50}$ era conservata per l'esame dell'azoto, $^1/_{10}$ per l'esame dei cloruri. Nel palloncino ove si conservava la 50ª parte dell'urina giornaliera si è messo dell'acido solforico, nel pallone ove si conservava invece la 10ª parte si è messo dell'acido fenico; ciò allo scopo di impedire la putrefazione dell'urina ed a fine di ciascun periodo esaminare la media di azoto e di sali eliminati giornalmente.

A prevenire delle perdite che si poteano avere per l'urina, che, proiettata alle pareti della gabbia, si fosse evaporata, lasciando quindi aderenti delle sostanze solide, si ebbe la cura ogni mattina di spruzzare contro le pareti, mercè un polverizzatore Richardson, dell'acqua distillata, che era ricevuta nel bicchiere sottostante destinato alla raccolta dell'urina. Nella urina l'azoto fu ricercato col metodo di Kjeldahl-Argutinsky; i cloruri col metodo di Volhard-Salkowsky. Tralasciammo l'esame delle feci.

Riferiamo sotto la forma riassuntiva di tabelle i risultati ottenuti:

Tabella A.

Esperienza 1ª (Cane 1°) — Ricerca calorimetrica.

Serie	Data	Media delle indicazioni spirometriche dopo raggiunto lo stato d'equilibrio	Ventilazione oraria	Temperatura dell'aria — Ambiente	Temperatura dell'aria — Ventilatrice	Umidità in gr. dell'aria — Ventilatrice	Umidità in gr. dell'aria — Ambiente	Vapore acqueo in gr. emesso dall'animale in un'ora	Pressione atmosferica	Peso dell'animale gr.	Calorie per ora — cedute al Calorimetro	Calorie per ora — trasportate dall'aria ventilatrice	Calorie per ora — totali per conduzione e irradiazione	Calorie perdute per vaporizzazione in un'ora	Calorie totali per ora
							Periodo senza sali.								
I	7.4.98	627	64.9	14°.7	18°.8	12.84	8 14	0.805	765	2880	14.814	0.072	14 891	0.188	14.574
II	8.4 98	642	63.85	14° 8	18°.85	11.74	8.42	0.21	764	2890	14 779	0.074	14.858	0.126	14.979
III	9.4.98	626	61.60	14° 8	19°.2	12 62	8.28	0 267	763	2905	14 292	0.078	14.370	0 160	14.580
IV	10.4 98	659	62.50	15°.1	19°.27	11.22	8.64	0.16	761	2900	15 289	0.074	15.368	0.096	14.459
V	11.4 98	586	68.20	15°.4	19°.54	10 82	8 62	0.14	758	2885	13.082	0.072	13.154	0.084	13.238
VI	12.4.98	626	64.70	15°.8	19°.88	9.84	8.78	0.07	754	2910	14 292	0.071	14.363	0 042	14.405
VII	13.4.98	618	60 65	16°.2	20°.3	9	7 22	0.11	754	2900	13.918	0.071	13.986	0 066	14.052
VIII	14 4.98	628	70.75	16°	20°.15	8 28	6.60	0.12	760	2890	14 228	0.068	14.806	0.072	14.878
IX	15.4.98	586	60.85	15°.7	19°.3	7.676	6.06	0 109	762	2900	13.082	0.064	13.146	0.060	13 206
X	16.4.98	577	69.05	15°.6	19°.85	7.584	6 60	0 07	759	2890	12.815	0.071	12 886	0.042	12.928
XI	17.4.98	504	67.25	16°.5	20°.42	7.97	5.904	0.14	756	2910	10.772	0.075	10 847	0.084	10.961
XII	18.4.98	568	61	17°.6	21°.3	9 08	7.85	0.10	756	2940	12.436	0.064	12.500	0.060	12.560
							Periodo con sali.								
I	19 4.98	612	65.45	17°.6	21°.85	9.168	7 808	0.09	757	2.915	13.872	0.078	13 950	0.054	12 004
II	20.4.98	558	71.40	17°.9	21°.8	9.016	8 18	0.08	754	2.900	12.298	0.079	12.872	0.036	12.408
III	21.4.98	577	77.25	18°.2	22°.1	10.896	8.98	0.11	758	2.880	12.815	0.092	12 907	0.066	12.973

TABELLA A[1]

Esperienza 1ª (Cane 1°). — **Esame chimico dell' urina.**

Serie	DATA della prelevazione	VOLUME giornaliero	VOLUME media	AZOTO totale gr.	AZOTO media gr.	CLORURI totale gr.	CLORURI media gr.
			Periodo con sali.				
I	8.4.98	290	318.3	13.8	2.3	2.136	0.356
II	9.4.98	320					
III	10.4.98	320					
IV	11.4.98	360					
V	12.4.98	350					
VI	13.4.98	270					
VII	14.4.98	270	283.3	13.879	2.313	1.782	0.297
VIII	15.4.98	350					
IX	16.4.98	320					
X	17.4.98	270					
XI	18.4.98	270					
XII	19.4.98	220					
			Periodo senza sali.				
I	20.4.98	335	288.33	6.15	2.05	9.15	3.05
II	21.4.98	250					
III	22.4.98	280					

TABELLA B.

Esperienza 2ª (Cane 1°). — **Ricerca calorimetrica.**

Serie	Data	Media delle indicazioni spirometriche dopo raggiunto lo stato di equilibrio.	Ventilazione oraria	Temperatura dell'aria		Umidità in gr. dell'aria		Vapore acqueo in gr. emesso dall'animale in un'ora	Pressione atmosferica	Peso dell'animale gr.	Calorie per ora			Calorie perdute per vaporizzazione in un'ora	Calorie totali per ora
				Ambiente	Ventilatrice	Ventilatrice	Ambiente				cedute al Calorimetro	trasportate dall'aria ventilatrice	totali per conduzione e irradiazione		
								Periodo senza sali.							
I	30 4.98	564	55.75	17°.6	21°	11.792	8.312	0.190	755	2945	12.459	0.053	12 512	0.114	12.626
II	1.5.98	562	60.1	17°.5	21°.1	12.182	8.156	0.240	758	2985	12.415	0.061	12.476	0.144	12.620
III	2.5.98	550	69.9	17°.9	21°.6	13.964	9 36	0.320	762	2925	12 051	0.073	12.124	0.192	12.316
IV	3.5.98	549	62.25	17°.8	21°.5	13.164	9.392	0.235	759	2950	12.029	0.062	12.099	0.141	12.232
								Periodo con sali.							
I	4.5.98	578	75.15	18°.1	22°.55	12.14	9.233	0.215	764	2920	12.837	0.084	12.921	0.129	13.050
II	5.5.98	608	62.93	18°.2	21°.6	11.24	7.908	0.210	760	2775	13.729	0.075	13.804	0.126	13.930

TABELLA B¹

Esperienza 2ª — (Cane 1°). — **Esame chimico dell'urina.**

Serie	DATA della prelevazione	VOLUME giorna-liero cc.	VOLUME media cc.	AZOTO totale	AZOTO media	CLORURI totale	CLORURI media
			Periodo senza sali.				
I	1.5.98	280	257.5	9	2.25	1.782	0.082
II	2.5.98	320					
III	3 5 98	210					
IV	4.5.98	220					
			Periodo con sali.				
I	5.5.98	220	192.5	4.45	2.225	5.34	2.67
II	6.5.98	165					

TABELLA C.

Esperienza 3ª (Cane 1º) — **Ricerca calorimetrica.**

Serie	Data	Media delle indicazioni spirometriche dopo raggiunto lo stato di equilibrio.	Ventilazione oraria	Temperatura dell'aria		Umidità in gr. dell'aria		Vapore acqueo in gr. emesso dall'animale in un'ora.	Pressione atmosferica	Peso dell'animale gr.	Calorie per ora			Calorie perdute per vaporizzazione in un'ora	Calorie totali per ora
				Ambiente	Ventilatrice	Ventilatrice	Ambiente				cedute al Calorimetro	trasportate dall'aria ventilatrice	totali per conduzione e irradiazione		
								Periodo senza NaCl.							
I	11.5.98	565	64.8	17º.4	21º.1	10.375	8.96	0 09	763	3000	12.481	0.068	12.549	0 054	12.603
II	12.5.98	50	53.85	18º	21º.3	10.95	9.115	0.10	759	2795	12.051	0.051	12.102	0.060	12 162
III	13 5.98	520	50.45	19º	22º.32	11.38	9.485	0.095	760	3030	11 185	0.047	11.232	0.057	11.289
IV	14 5 98	520	54.45	18.75	21º.95	8.44	7.18	0 065	763	3085	11.185	0.046	11.231	0.039	11 270
								Periodo con NaCl.							
I	15.5 98	560	46.56	18º.37	21º.5	7.66	7.176	0.02	769	3055	12.337	0.042	12.379	0.013	12.392
II	16.5 98	506	52.50	18º.34	21º.9	8.625	8.184	0.02	765	3070	12.533	0 053	12.586	0 013	12.569
III	17.5 98	563	49.4	18º.5	21º.83	9.456	8.648	0.02	761	3175	12.437	0 047	12 484	0.012	12.496
IV	18.5 98	564	50.4	19º.2	22º.2	9.55	6.28	0.16	758	3160	12.459	0.042	12.501	0.096	12.597
V	19.5.98	577	55.55	20º.6	23º.7	15.29	8.404	0.635	754	3260	12.815	0.048	12.863	0.381	13.244
VI	20.5 98	536	50.45	20º.6	23º.5	13.962	7.296	0.335	763	3250	13.082	0 043	13.125	0.201	13 326

TABELLA C^1

Esperienza 3ª (Cane 1°). — **Esame chimico dell'urina.**

Serie	DATA della prelevazione	VOLUME		AZOTO		CLORURI	
		giornaliero cc.	media cc.	totale gr.	media giornaliera gr.	totale gr.	media giornaliera gr.
			Periodo senza NaCl.				
I	12.5.98	310	370	10.075	2.51875	1.54	0.385
II	13.5.98	360					
III	14.5.98	460					
IV	15.5.98	350					
			Periodo con NaCl.				
I	16.5.98	340	350	13.98	2.33	19.26	3.21
II	17.5 98	380					
III	18.5.98	310					
IV	19.5.98	310					
V	20.5.98	400					
VI	25.5.98	360					

TABELLA D.

Esperienza 4ª (Cane 2º) — **Ricerca calorimetrica.**

Serie	Data	Media delle indicazioni spirometriche dopo raggiunto lo stato di equilibrio	Ventilazione oraria	Temperatura dell'aria		Umidità in gr. dell'aria		Vapore acqueo in gr emesso dall'animale in un'ora.	Pressione atmosferica	Peso dell'animale gr.	Calorie per ora			Calorie perdute per vaporizzazione in un'ora	Calorie totali per ora
				Ambiente	Ventilatrite	Ventilatrice	Ambiente				cedute al Ca'orimetro	trasportato dall'aria ventilatrice	totali per conduzione e irradiazione		
								Periodo senza N a C l.							
I	14.5.28	482	52	18º.75	21º.7	9.275	7.84	0 075	467	1885	10.123	0.044	10 167	0.045	10 212
II	15.5.98	476	50	18º.24	20º.9	8.64	7 24	0.07	769	1880	9.958	0.038	9.996	0 042	10.038
III	16 5.98	482	51.35	18º 15	20º.8	9.20	8 272	0 048	767	1885	10 123	0.039	10 162	0 020	10 182
V	17.5 98	481	60.25	18º.3	21º.2	9 85	8.416	0 085	762	1950	10 102	0.052	10.754	0·051	10.205
								Periodo con N a C l.							
I	18 5.98	499	51.65	18º.5	21º.2	8.08	6.872	0.060	757	1950	10 614	0.033	10.647	0.036	10.683
II	19.5 98	486	56.10	19º.9	22º.8	9.075	7.92	1.065	758	2000	10.240	0.033	10.273	0.039	10.312
III	20.5.98	493	48 9	20º 5	23º 35	11.67	8.264	0 165	762	2025	10 453	0.039	10.492	0.099	10.591
IV	21.5.98	486	50 72	19º.8	22º.8	14 555	9.5	0.255	765	2045	10.240	0.048	10.288	0 158	10.436
V	22.5.98	501	51.80	19º.6	22º 58	12.973	7 456	0 285	763	2045	10.656	0.044	10.700	0.171	10.871
VI	23 5.98	505	46.84	19º 9	22º.65	12.873	8.498	0 205	762	2100	10.772	0.037	10.809	0.123	10.932

TABELLA D[1]

Esperienza 4ª (Cane 2°). — **Esame chimico dell'urina.**

Serie	DATA della prelevazione	VOLUME giornaliero	VOLUME media	AZOTO totale gr.	AZOTO media gr.	CLORURI totale gr.	CLORURI media giornaliera gr.
			Periodo senza $NaCl$.				
I	15.5.98	190	187.5	6.1	1.525	1.196	0 229
II	16.5.98	240					
III	17.5.98	160					
IV	18.5.98	160					
			Periodo con $NaCl$.				
I	19.5.98	180	192.5	8.85	1.475	17.16	2.86
II	20.5.98	190					
III	21.5.98	195					
IV	22.5.98	280					
V	23.5.98	190					
VI	24.5.98	120					

Nella Tab. I sono riuniti in un sol quadro i valori medi dell'azoto e dei cloruri eliminati coll' urina in ciascun periodo dell' esperienze fatte nel cane I° e nel cane II°.

Dallo studio di essa risulta:

TABELLA I.

Valori medii ricavati dalle tabelle A^1 B^1 C^1 D^1

Esperienza	Periodo	Durata in giorni	Peso dello animale	Volume di urina	Azoto gr.	Cloruri gr.
I	1°	6	2895	313 3	2 3	0.336
		6	2905	283.3	2.313	0.297
	2°	3	2898	283.33	2 05	3.05
II	1°	4	2951	257.5	2 25	0.302
	2°	2	2847	192.5	2.225	2 67
III	1°	4	3082.5	370	2.52	0.335
	2°	6	3161.6	350	2.33	3.21
IV	1°	4	1900	187.5	1 525	0.299
	2°	6	2028	192.5	1.475	2 86

1° Che il peso dell'animale I° e II° nei varî giorni delle esperienze 1ª e 2ª e nei varî giorni del primo periodo delle esperienze 3ª e 4ª presentò differenze lievissime, quasi trascurabili; invece nel secondo periodo delle esperienze 3ª e 4ª, in cui all'alimento fu aggiunto un'adatta dose di sal di cucina, il peso dei due cani ebbe un crescendo non interrotto. Ciò collima cogli esperimenti di alcuni autori, che hanno constatato un miglioramento nel peso degli animali dietro l' uso nel cibo di sal di cucina; un tale aumento di peso nei nostri esperimenti non potrebbe spiegarsi con una imbibizione acquosa dei tessuti, poichè essendo stata costante l' acqua bevuta (Ved. met. di ricerca) ed essendo state piccole le differenze nel volume giornaliero di urina emessa dall' animale è esclusa qualunque ritenzione di acqua nell'organismo, o se non altro una ritenzione tale di acqua da mettersi in riscontro coll'aumento di peso.

Il non avere i due cani, nel secondo periodo della 3ª e 4ª esperienza, mostrato il bisogno di bere maggior quantità di acqua che nel primo periodo, ed il non essersi elevato il volume giornaliero di urina

dimostra che entro dati limiti il sale di cucina non provoca sete, nè diuresi e che ingerito a forti dosi agirà solo indirettamente come diuretico, poichè in tali casi maggiore è la quantità di acqua che per l'eccesso di cloruro di sodio è bevuta dall'animale.

2° Che l'azoto medio emesso nelle due metà del primo periodo dell'esperienza 1ª è stato identico. Or la costanza di peso avutasi durante tutto il periodo, e il sapere che la distruzione dell' albumina è indipendente dal freddo o calore, dal riposo o lavoro, dal sonno o dalla veglia ed invece sta in uno stretto rapporto entro date regole con la quantità di sostanze azotate assorbite, ci permette di affermare che costante sia stata la copia delle materie albuminoidi e conseguentemente dei grassi e dei carboidrati assorbiti ciascun giorno da un cibo sempre uguale per quantità e qualità.

Una tale affermazione, siamo sicuri, avrebbe avuto la conferma più positiva se per ragioni di tempo non si fosse trascurato l'esame delle feci. Se la nostra convinzione non trova riscontro nei risultati di altri esperimentatori, i quali nei casi di inanizione minerale hanno trovato invece diminuzione di sostanze azotate assorbite, ciò può spiegarsi perchè mentre noi limitammo l'esperienza al breve periodo di 12 giorni, quelli invece sperimentarono per lungo tempo, durante il quale è possibile la deficienza dei sali disturbi il potere digestivo e di assimilabilità delle sostanze alimentari.

3° Che l'azoto medio eliminato nel secondo periodo delle prime due esperienze, è stato alquanto minore; ma ciò può spiegarsi col fatto che il cane nel detto periodo si alimentò male.

Quanto non può a prima vista spiegarsi è perchè anche nel 2° periodo delle esperienze 3ª e 4ª si sia avverata, a paragone del 1° periodo, una diminuzione sensibile nell'emissione di azoto con l'urina, non ostante fosse stata identica nei due periodi la quantità e qualità del cibo, e non ostante l'aumento di peso nel 2° periodo e la somministrazione di cloruro di sodio (che poteva, se dobbiamo credere alle esperienze di alcuni ricercatori, influire favorevolmente e mai sfavorevolmente sulla digeribilità e assimilabilità delle sostanze proteiche, o in genere sulla funzionalità digestiva del tubo gastro-enterico) escluda che fosse avvenuta nel detto periodo una minore assimilazione delle soslante albuminoidi.

La spiegazione si trova abbastanza soddisfacente nelle esperienze di Dubelir [1] e Pugliese [2] nei cani, di Gabriel [3] nel montone, di Pu-

[1] *Nach einige Versuche über d. Einfluss des Vassers ecc.*, Zeitsch. f. Biologie, 1891.

[2] *Azione del cloruro di sodio e di potassio ecc.*, Archivio di Farmacologia e Terapeutica, Vol. III.

[3] *Ueber d. Wirkung des Kochsalzes ecc.*, Zeitsch. f. Biologie, 1892.

gliesi e Goggi [1] nell'uomo; dalle quali ricerche, contrariamente alle affermazioni di Voit [2], Weitke [3] e Feder [4], che la somministrazione del cloruro sodico acceleri il ricambio materiale, è dimostrato invece che il cloruro di sodio penetrato nell'organismo determina un risparmio delle sostanze azotate.

Riepilogando, quindi, possiamo dallo studio della Tab. I ricavare due conseguenze importanti:

Che in un breve periodo di tempo la deficienza dei sali minerali non disturba la funzionalità gastro-enterica e non altera sensibilmente l'assimilabilità delle materie alimentari;

Che l'aggiunta di sale di cucina nel cibo, mentre migliora la nutrizione dell'animale (prova ne sia l'aumento sempre crescente di peso nel periodo con sale in confronto del periodo senza sale), d'altra parte attenua la disintegrazione delle materie albuminoidi.

La ricerca dei cloruri nulla ci dimostra, se non che essi, scarsi nel periodo senza sali, aumentarono invece in quello con sali.

Dando uno sguardo alle tabelle *A*, *B*, *C*, *D*, si può rilevare a colpo di occhio:

Che a causa della modica ventilazione, la quale non andò oltre i 77 litri all'ora, la quantità di calore trasportata dall'aria è stata molto esigua in confronto a quella ceduta per irradiazione e conduzione allo spazio mantellare del calorimetro. Sicchè se variazioni si sono avverate nell'emissione di calore, sia nei vari giorni di uno stesso periodo, come nei due periodi di ogni esperienza, esse si riscontrano precipuamente nel numero di calorie registrate dal calorimetro;

Che anche per l' evaporazione, la quale non è proceduta proporzionalmente al grado di umidità dell'ambiente, la perdita di calore è stata piccolissima relativamente a quella emessa per irradiazione e conduzione.

Perciò nello studio comparativo delle calorie perdute dai due cani nei due periodi delle quattro esperienze terremo conto esclusivamente del calore ceduto per conduzione e irradiazione.

---

[1] *Azione del cloruro di sodio sul ricambio materiale dell'uomo.* - Atti della R. Accademia dei Fisiocritici, Serie IV, Vol. VII.

[2] *Untersuch. über, den Einfluss des Kochsalzes ecc.* - München, 1860.

[3] *Versuche über den Einfluss des Kochsalzes ecc.* - Maly's yahresber, Volume VI, 1874.

[4] *Uber die. Ausscheidung des Salmiaks ecc.* - Zeitsch. f. Biologie, 1878.

TABELLA II.

Valori medi ricavati dalla Tabella *A*.

Giorni	Temperatura ambiente		Calorie emesse per irradiazione e conduzione in un'ora		Calorie totali per ora		Calorie per kg. e per ora in base al peso medio di gr. 2900
			Periodo senza sali.				
I	14°.7		14.391		14.574		
I.	14°.8	14°.85	14.353	14.744	14.979	14.885	5.133
III	14°.8		14.370		14 580		
IV	15°.1		15.863		14.459		
V	15°.4		13.154		13.263		
VI	15°.8	15°.85	14.363	13.952	14.405	14.018	4 834
VII	16°.2		13.986		14 052		
VIII	16°.0		14.306		14 378		
IX	15°.7		13.146		13.206		
X	15°.6	16°.35	12.886	12.345	12.928	12.406	4 276
XI	16°.5		10.847		10.931		
XII	17°.6		12.500		12 560		
			Periodo con sali.				
I	17°.6		13.950		14.004		
II	17°.9	17°.9	12.372	12.807	12 408	12 846	4.430
III	18°.2		12 907		12.973		

Dalla tabella II^a, in cui sono riuniti e calcolati i principali dati riferiti nella Tab. *A*, risulta chiaramente:

Che la emissione di calore avveratasi nella stessa ora della giornata durante il periodo senza sali della 1ª esperienza, è andata man mano diminuendo, sì che da un massimo di 15,363 che si è avuto al principio del periodo, abbiamo verso la fine avuto un minimo di 10,847 calorie, vuol dire che si è avverato nella perdita e quindi nella produzione di calorie, essendo entrambe correlative, un abbassamento del 29. 4 per cento circa.

Questa diminuzione nelle perdite di calore si va facendo relativamente sempre più rilevante man mano che ci avviciniamo alla fine del periodo.

Difatti, calcolata la media delle calorie perdute di 4 in 4 giorni, troviamo che mentre da 14. 744 calorie all'ora, quale era la perdita media nei primi 4 giorni si scende a 13. 952 calorie, media dei successivi 4 giorni, poi da 13. 952, le calorie si riducono negli ultimi 4 giorni ad una media giornaliera di 12.345.

Cioè mentre dal primo terzo di periodo al secondo si ha nell'emissione calorica un abbassamento del 5. 37 per cento, dal secondo all'ultimo terzo di periodo l'abbassamento avviene nella proporzione del 13 per cento.

Posto ciò si domanda: quale la causa che nello stesso animale, alla stessa ora della giornata, alimentato con cibo costante per qualità e quantità, mantenuto per quanto era possibile nelle stesse condizioni di riposo in tutto il periodo, quale la causa, che ha determinato questa diminuzione progressivamente crescente nella perdita di calore per irradiazione e conduzione?

Non si può invocare certo l'umidità, poichè noi abbiamo visto già quanto poco influisca sul grado di evaporazione; del resto quest' ultimo interviene così poco nella somma totale delle calorie emesse, che noi abbiamo posto la dicussione solo sulla quantità di calore emesso per irradiazione e conduzione.

Si potrebbe invocare l'inalzarsi della temperatura atmosferica.

Ma se così fosse, allora la diminuzione nella perdita di calore, avrebbe dovuto seguire le stesse oscillazioni che la temperatura ha presentato.

Ma la cosa non è proceduta in questo modo.

Difatti calcolando per ciascun terzo del periodo la temperatura media avutasi, troviamo che mentre dal 1° al 2° terzo del periodo la temperatura aumentò di un grado, e la diminuzione nella perdita di calorie fu del 5. 37 per cento, invece per mezzo grado di aumento di temperatura avutosi nell' ultimo terzo si è avuta una diminuzione del 13 per cento, cioè del 26 per cento per un grado di differenza.

È vero che negli omeotermi la perdita di calore si comporta di una maniera differente dalla legge di Newton (la quale stabilisce che il raffreddamento per irradiazione di un corpo è proporzionale per una eguale superficie all'eccesso di temperatura di questo corpo su quella dell'ambiente). Ma ciò è vero però per temperature più basse di 12°-14°; difatti D'Arsonval pel primo e Ch. Richet, Langlois, Sigalas dopo hanno per molte esperienze dimostrato che se, al disotto di un certo *optimum* di temperatura atmosferica, la perdita di calore per irradiazione anzicchè aumentare va diminuendo, invece al disopra di questo *optimum*, che per la più parte degli animali è compreso tra 12°-13°-14°, l'irradiazione calorica va diminuendo conformemente alla legge di Newton. [1]

Non è poi solo la nessuna proporzione tra aumento di temperatura e diminuzione sempre crescente di perdita calorica nel 1° periodo, che ci fa escludere sia stata l'elevazione di temperatura la sola e vera causa dell'abbassamento avveratosi nell'emissione calorica durante tutto il tempo del 1° periodo.

Poichè se passiamo a studiare i dati calorimetrici del 2° periodo della stessa 1ª esperienza, è facile rilevare:

Che nel 2° periodo lo stesso cane non ostante l'aumento di temperatura di più di 1° 5 (poichè da una media di 16° 35 avuta nell'ultimo terzo del 1° periodo si è passato ad una media di 17° 9), ad onta della difettosa nutrizione dal punto di vista quantitativo, tuttocchè messo nelle stesse condizioni del 1° periodo colla sola differenza che gli si faceva ingerire una soluzione delle ceneri ottenute dal brodo di carne e di riso (vedi metodo di ricerca), perdette un numero di calorie più rilevante, che non nell'ultimo terzo del 1° periodo; si è avuto difatti nell'emissione calorica un aumento del 3. 74 per cento.

Di conseguenza, se pure non si voglia scartare del tutto l'influenza dei mutamenti di temperatura, il coefficiente orario di calore perduto non è perciò funzione della temperatura ambiente e può modificarsi indipendentemente da questa.

Anche la Tab. IIIª conferma il dato di fatto rilevato nella Tab. IIª, che cioè ad onta dell'aumento di temperatura nel 2° periodo della 2ª esperienza si ebbe nondimeno aumento nell'emissione di calore, e ciò nella proporzione dell'8, 63 per cento.

---

[1] Ved. *Chaleur* nel Diction. de physiologie par CH. RICHET, pag. 138.

TABELLA III.

Valori medi ricavati dalla Tabella *B*.

Giorni	Temperatura ambiente		Calorie emesse per irradiazione e conduzione in un'ora		Calorie totali per ora		Calorie per kg. e per ora in base al peso medio di gr. 2900
			Periodo senza sali.				
I	17° 6	17° 7	12.512	12.301	12.626	12.448	4.292
II	17° 5		12.476		12.620		
III	17° 9		12.124		12.316		
IV	17° 8		12.091		12.232		
			Periodo con sali				
I	18° 1	18° 15	12.221	13.363	13.050	13.490	5.00
II	18° 2		13.804		13.930		

Ancora più dimostrative sono le esperienze 3ª e 4ª, nelle quali l'alimentazione procedette, nel 2° periodo, così regolare come nel 1°.

TABELLA IV.

Valori medi ricavati dalla Tabella *C*.

Giorni	Temperatura ambiente		Calorie emesse per irradiazione e conduzione in un'ora		Calorie totali per ora		Calorie per kg. e per ora in base al peso medio di gr. 3190
			Periodo senza N a C l.				
I	17° 4	18° 29	12 549	11° 778	12 603	11 831	3 816
II	18°		12 102		12 162		
III	19°		12 232		11 289		
IV	18° 75		11 231		11 270		
			Periodo con N a C l.				
I	18° 37	19° 27	12 379	12° 651	12 392	12 771	4 12
II	18° 34		12 556		12 569		
III	18° 5		12 484		12 496		
IV	19° 2		12 501		12 597		
V	20° 6		12 863		13 244		
VI	20° 6		13 125		13 326		

TABELLA V.

Valori medi ricavati dalla Tabella *D*.

Giorni	Temperatura ambiente		Calorie emesse per irradiazione e conduzione in un'ora		Calorie totali per ora		Calorie per kg. e per ora in base al peso medio di gr. 2000
			Periodo senza N a C l.				
I	18° 75		10 167		10 212		
II	18° 24	18° 28	9 996	10° 120	10 088	10 162	5 081
III	18° 15		10 162		10 182		
IV	18° 8		10 154		10 205		
			Periodo con N a C l.				
I	18° 5		10 647		10 688		
II	19° 9		10 278		10 812		
III	20° 5	19° 07	10 492	10° 554	10 591	10 687	5 318
IV	19 8		10 283		10 486		
V	19° 6		10 700		10 871		
VI	19° 9		10 809		10 962		

Le Tab. IV e V riguardano i valori medî delle ricerche calorimetriche nei cani I° e II°, alimentati in un primo periodo con una data razione di carne e riso senza aggiunta di sale di cucina, ed in un 2° periodo con una identica razione addizionata però di sale di cucina. Ebbene da tali tabelle risulta che, mentre nel periodo senza sale l'emissione calorica non diminuì punto, ma presentò solo oscillazioni di poco rilievo non corrispondenti a quelle della temperatura ambiente, invece nel periodo con sale, non ostante l'elevazione della temperatura ambiente, si ebbe anche aumento di emissione calorica nella proporzione del 7, 41

per cento nell'esperienza col cane I e del 4. 09 per cento in quella del cane II.

Se si considera poi che ove il 1° periodo di queste due ultime esperienze fosse stato molto più lungo, in modo che la deficienza del sale di cucina si fosse fatta sentire più accentuatamente in seno all'organismo, forse allora, come si è avverato nella 1ª esperienza, l'emissione calorica giornaliera si sarebbe andato man mano rimpicciolendo; e quindi si sarebbe potuto meglio rilevare, da un lato la indipendenza dell'emissione calorica dai mutamenti della temperatura ambiente e dall'altro lato la corrispondenza che esiste tra l'aumento della perdita di calore e il miglioramento nella composizione minerale del pasto.

Abbiamo creduto utile, per far risaltare a colpo d'occhio le considerazioni fatte sin qui su ciascuna esperienza, riunire in un quadro complessivo i dati medî delle tabelle II-V.

TABELLA VI.

Quadro complessivo delle Tabelle II, III, IV, V.

Esperienze	Periodo	Numero dei giorni	Calorie emesse per irradiazione e conduzione in un'ora	Calorie totali per ora	Calorie per Kg. e per ora	Temperatura ambiente media
I	1°	4	14.744	14 885	5.133	14.85
		4	13.952	14.018	4.834	15.85
		4	12.345	12.406	4.276	16.85
	2°	3	12.807	12.846	4.430	17.9
II	1°	4	12.305	12 448	4 292	17.7
	2°	2	13.863	13.490	5	18.15
III	1°	4	11.778	11.831	3.816	18.29
	2°	6	12.651	12.771	4.12	19.27
IV	1°	4	10.120	10 562	5.081	18.26
	2°	6	10.584	10.687	5.318	19.7

Adunque non è nei fattori esterni, che noi possiamo rintracciare la ragione dei mutamenti avveratisi nell'emissione del calore lungo le quattro esperienze instituite sui due cani.

La corrispondenza invece delle variazioni nel coefficiente orario calorimetrico colle variazioni nella composizione minerale del pasto ci induce a pensare che è dalla varia' quantità di calorie prodottesi nell'organismo dipesa principalmente la quantità varia di calorie disperse; produzione di calorie che sarà stata nei vari tempi di ogni singola esperienza più o meno elevata secondo la presenza o deficienza dei sali minerali nell'alimento.

Molti fisiologi ammettono come legge fondamentale che la *produzione di calore, che ciascun organismo richiede dagli elementi intraorganici, è dipendente dal bisogno della sua calorificazione generale.*

Così C. von Noorden scrive, che non è secondo l'eccesso o il difetto di calore, dovuto alle combustioni intraorganiche, che l'organismo perde più o meno calore per la sua periferia, ma al contrario è secondo le perdite di calore, subite per la superficie, che l'organismo regola la grandezza delle sue decomposizioni chimiche.

Questa dipendenza è appoggiata dal fatto rilevato da Regnault e Reiset, ed imposto all'attenzione dei fisiologi da Rubner e Ch. Richet, che in animali di diversa taglia le perdite di calore sono più rilevanti, per unità di peso, nei piccoli che nei grandi animali. [1]

E ciò perchè i piccoli, avendo per rapporto al loro peso una superficie più grande, perdono nel medesimo tempo delle quantità di calore più considerevoli.

Secondo questo modo di vedere, ciascun soggetto ha il suo coefficiente calorimetrico proprio, il quale in un animale allo stato di riposo varierà correlativamente alle perdite, che sarebbero governate dalla temperatura esterna; se la irradiazione calorica si fa minore per aumentata temperatura esterna, la produzione di calorie all'interno si deve abbassare e viceversa.

Ma se la *legge di superficie* ha il suo gran valore e serve a dimostrare come tra *diversi animali* la quantità di calorie prodotte è funzione dell'ampiezza della superficie emissiva,non ha però forza dimostrativa per dire in modo assoluto che nello *stesso animale* si produca tanto calore quanto se ne perde, e negare dall' altra parte che se ne possa perdere di più o di meno, corrispondentemente all'aumento o diminuzione delle combustioni intraorganiche.

---

1 Ved. LAMBLING - *Les echanges nutrit.* - Vol. IX dell'Encyclop. chimique i FREMY.

Perchè allora come spiegarci i seguenti fatti?

Si sa che un animale, posto anche nelle stesse condizioni esterne, immediatamente dopo l'ingestione degli alimenti, presenta un bilancio totale di calorie più forte che non prima del pasto.

Molti autori, tra i quali (Spech, Zuntz e Mering, Leo, Wolfers, Potthost e Magnus-Levy (vedi Magnus-Levy, *Pfluger's Arch.*, 1893), contrariamente a Fick (Maly's Jahresb., 1890, vol. XX. pag. 362), il quale sostiene che le combustioni si aumentano appena che dopo la digestione penetra nel torrente circolatorio il materiale combustibile e specialmente l'albumina, affermano: che l'aumento delle decomposizioni chimiche è unicamente dovuto al lavoro della digestione.

Ammesso pure ciò, non viene escluso, che nello stesso animale la produzione di calore possa variare nelle varie ore della giornata e quindi nei varii giorni per tutt' altra causa che non sia la perdita di calore regolata dalle variazioni di temperatura esterna.

E così come pel lavorio della digestione, quanti altri fenomeni fisico-chimici non si avverano nell'interno dell'organismo, che sfuggono al nostro controllo e che intanto influiranno a modificare la produzione e quindi la perdita di calore?

Si sa che gli animali, tutto che posti in un ambiente, la cui temperatura eguaglia quella del sangue, continuano ciò non pertanto ad emettere calore per irradiazione ed evaporazione. Per ragione fisica la perdita per irradiazione dovrebbe essere nulla; se perdita ci è dunque, questa non può essere dovuta se non alla produzione incessante, tuttochè abbassata, di calorie all'interno.

Si sa inoltre che un animale, alimentato con una maggior copia di sostanze azotate che non nel passato, pur continuando a vivere nelle stesse condizioni di lavoro muscolare e di temperatura esterna, elimina coll'urina una maggior quantità di azoto che non nei giorni precedenti. Questo dippiù di azoto è il prodotto dei fenomeni chimici, di cui furon preda le sostanze albuminoidi assimilate in maggior copia, e che hanno dovuto modificare il coefficiente calorico proprio dell'animale.

Si sa ancora, che un animale, il cui cofficiente calorico si sia mantenuto costante, rimanendo identiche le condizioni di temperatura esterna e di lavoro, abbassa questo coefficiente man mano che si assottiglia il regime alimentare.

Tutti questi fatti conducono ad ammettere che non sia assoluta la legge fisiologica, per la quale la produzione di calore nell'interno dell'organismo sia quasi esclusivamente subordinata alla dispersione dello stesso calore verso l'esterno; piuttosto inducono ad ammettere che una tale produzione possa variare, oltre che per le condizioni di tempera-

tura ambiente, anche per altri fattori intraorganici, tra i quali secondo le nostre esperienze è da annoverarsi la presenza o deficienza di una da qualità e quantità di sali minerali introdotti coll'alimento.

Pertanto, dopo lo studio fatto sui dati sperimentali del ricambio materiale e della calorificazione nei nostri animali, ci è permesso affermare:

1° Che nell'inanizione minerale quasi completa, non ostante si conservi inalterata (per un breve periodo di tempo) l'assimilabilità e la distruzione intraorganica dei principî alimentari (prova ne sia la costanza di peso e di azoto emesso con l'urina), la produzione di calore va sempre più abbassandosi;

2° Che somministrando gli alimenti con quella composizione minerale che hanno in natura, la produzione calorica presenta piccole oscillazioni, che non possono in alcun modo riferirsi a quelle della temperatura ambiente, ma non diminuisce punto;

3° Che l'aggiunta di sale di cucina negli alimenti e quindi la presenza dello stesso in quantità sufficiente nell'organismo, non solo favorisce l'organizzazione degli alimenti assorbiti (prova ne sia il peso accresciuto dell'animale e la minore disintegrazione delle sostanze azotate, ma rende possibile con un minor consumo di materiale combustibile una maggior produzione di calore.

Per quale meccanismo si avvera quest'ultima influenza?

La prima ipotesi potrebbe essere che il cloruro di sodio modifichi le condizioni fisiche della superficie radiante, cioè della cute, sia per effetto di imbibizione aumentando così il potere di radiazione o quello di conducibilità o entrambi insieme, sia per effetto di una più attiva circolazione periferica elevando il grado della temperatura cutanea.

Una seconda ipotesi potrebbe essere quella che il sale di cucina valga, come tanti altri nervini, a rendere più attivi i fenomeni di combustione intraorganica.

Ma queste due ipotesi implicano per se maggior consumo di materiale combustibile, ciò che non avviene, come abbiamò visto, quando il sale non fa difetto nell'organismo.

A nostro modo di vedere le ipotesi, per le quali si possono collegare i due fatti rilevati: minore scomposizione di principii alimentari assorbiti, maggiore produzione di calore, possono essere le seguenti

o che la messa in circolazione del sale di cucina compia o determini degli scambi chimici con gli altri sali e tra gli altri sali minerali, capaci di dar luogo a produzione di calore;

o che la presenza del cloruro di sodio nelle combinazioni organiche renda possibile in queste, sia una ossidazione più completa sino ai pro-

dotti finali di regressione, sia una serie di molti altri processi chimici (idratazione, sdoppiamento, ecc.), che non possono avverarsi senza il concorso di una determinata quantità e qualità di elemento minerale e che pertanto fanno manifesta tutta la forza viva presente allo stato potenziale nel materiale organico.

È lecito ammettere, che al pari del cloruro di sodio anche tutti o parte degli altri sali, che si introducono coll'alimento, possano contribuire in modo diretto o indiretto alla produzione di forze vive sotto forma di calore senza obbligare per tanto l'organismo ad una maggiore disintegrazione delle materie organiche.

Dopo ciò si rivela grande il vantaggio, che il sale di cucina (e deve così pensarsi per altri sali minerali) spiega nell'economia animale, e la necessità di rendere più agevole e più economica agli uomini ed agli animali la provvista del sale di cucina, tanto scarso negli alimenti vegetali.

Noi chiudiamo il nostro lavoro, paghi di avere semplicemente additato la parte attiva (sinora negata) che i minerali prendono nella termogenesi animale. Riconosciamo intanto che un largo campo di esperienze resta ancora per rischiarare pienamente l'importanza dei sali in massa o di ciascuno di essi nella termogenesi animale e conseguentemente l'utilità del loro intervento nel cibo; come riconosciamo inoltre che nè le nostre esperienze nè altre sullo stesso ordine varranno da sole a sciogliere l'inesplicato perchè i sali minerali rappresentano per la vita animale un alimento che non deve mancar mai.

APPENDICE

Descrizione del calorimetro ad aria di Rubner e modo di usarlo

Il calorimetro, di cui mi sono servito nelle mie ricerche calorimetriche precedentemente riferite, coadiuvato dal dott. G. Dolce, è quello stesso che Rubner ha adoperato sino a pochi anni fa per i suoi classici lavori sulla *Calorimetria animale*, e trovasi descritto nella *Zeitsch f. Biologie*, 1889, a pag. 400.

Rubner ha voluto ultimamente modificare la forma, le dimensioni e la disposizione dell'apparecchio, e l'ha corredato di nuovi accessori e specialmente di apparecchi autoregistratori, che permettono di potere, senza l'assistenza continua dell' esperimentatore, seguire di ora in ora lungo notti e giorni le calorie cedute dall' animale di ricerca. La descrizione di questo nuovo calorimetro è fatta dettagliatamente nella *Zeitsch f. Biologie*, 1893, pag. 91 e nell'opuscolo: *Calorimetrische Methodik*, Marburg, 1895.

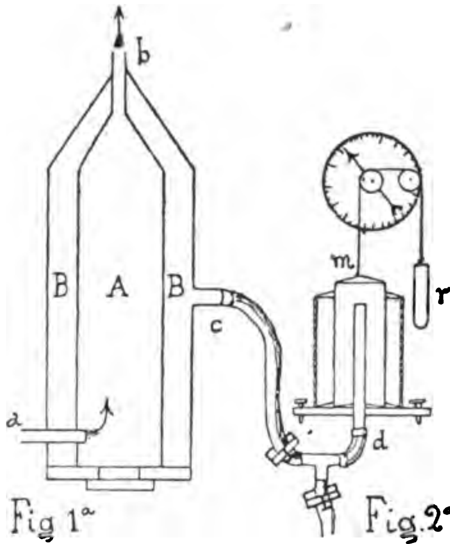


Fig 1ª Fig. 2ª

Perchè l'impiego di un sì prezioso strumento, tanto importante per ricerche igieniche come per quelle di fisiologia, fosse reso più noto nel nostro paese, in modo da invogliare gli studiosi delle discipline igieniche e fisiologiche a farne tesoro in molti argomenti che tuttora attendono la soluzione da ricerche sperimentali sulla calorimetria animale, e perchè ho semplificato certe pratiche, che a me sembra facilitino l'uso dell'apparecchio e permettano di ottenerne indicazioni esatte, ho creduto bene riferire sul calorimetro, che io ho adoperato, facendo tesoro pertanto delle istruzioni che il Rubner dà nelle due citate pubblicazioni.

L'apparecchio, come si osserva nella fig. 1ª, consta di due cilindri di ottone con un estremo imbutiforme, disposti l'uno dentro l'altro in modo che ne risulta:

1. Uno spazio cilindro-conico *A*, della capacità di circa litri 26, detto *spazio di ricerca*, destinato a contenere l'animale (o qualunque altra sorgente calorifica), e che è provvisto di un largo foro di entrata e di due tubi *a* e *b*, comunicanti coll'ambiente esterno;

2. Uno spazio chiuso *B*, detto *spazio mantellare*, che per un tubo laterale *c* si fa comunicare ora coll'ambiente, ora coll'apparecchio, che serve a registrare le modificazioni di tensione o di volume, che l'aria chiusa nello spazio *B* subisce per riscaldamento o raffreddamento sia dell'ambiente esterno, come dello spazio *A* per la presenza dell'animale.

Il detto apparecchio registratore è, nel calorimetro dell'Istituto, un *volumenometro* o *spirometro*, il quale come vedesi dalla fig. 2ª (rappresentante uno spaccato dell'apparecchio) consta di:

a) un vaso cilindrico di latta, del diametro di cm. 95 e alto cm. 28, al centro del cui fondo è innestato un tubo *d*, che si eleva sino a pochi centimetri sotto i bordi del vaso;

b) una campanella *m*, fatta di una lamina sottilissima di ottone, il cui fondo rivolto in alto si eleva di alcuni centimetri dall'orlo del vaso;

c) un gran disco circolare, diviso esattamente alla periferia in 360 parti, sospeso al disopra del vaso ed il cui piano corrisponde a quello dell'asse verticale e centrale del vaso; due rotelle, leggermente incavate alla periferia per potervi scorrere un cordoncino di seta, stanno attaccate alla faccia posteriore del disco, l'una posta al centro, l'altra all'estremo del diametro trasverso; il cordoncino, che scorre sul solco delle rotelle mobilissime, sostiene ad un'estremo la campanella, all'altro estremo un cilindro di rame cavo *r*, riempito di tante palline di piombo, quante sono necessorie per neutralizzare quasi del tutto la resistenza ad alzarsi della campanella; l'asse della rotella centrale sostiene un indice che muovendosi sul quadrante segna in gradi il sollevamento della campanella.

Il vaso dello spirometro si riempie, secondo consiglia Rubner, per $^2/_3$ di petrolio Io mi sono servito di olio di vasellina, che senza presentare l'inconveniente di emanare vapori di ingrato odore e il pericolo d'infiammarsi risponde bene allo scopo di permettere il sollevamento o abbassamento senza attrito della campanella.

Il principio, su cui si basa il calorimetro ad aria di Rubner, sta in ciò: che ponendo nello spazio A una sorgente calorifica, l'aria chiusa nello spazio B aumenta di temperatura sino a che il calorimetro cede nell'unità di tempo tanto calore all'ambiente esterno quanto ne riceve dalla sorgente calorifera. Questo aumento di temperatura fa dilatare l'aria racchiusa nel mantello, e questa dilatazione è corrispondentemente rilevata e graduata dal volumenometro, con cui si fa comunicare lo spazio mantellare.

Se la sorgente calorifica emette nell'unità di tempo quantità costanti di calore, allora quando verrà il momento, in cui l'aria mantellare emette tanto calore quanto ne riceve, l'indice dello spirometro segnerà lo stesso grado, avremo così quel che si dice: *lo stato d'equilibrio*.

Qualunque sia il grado di temperatura atmosferica nei vari giorni di

esperimento, purchè durante l'esperimento la temperatura non varia, una stessa sorgente calorifica posta entro lo stesso calorimetro farà subire all'aria mantellare un riscaldamento, che allo stato di equilibrio sarà di un numero costante di *t* gradi di più della temperatura iniziale e che obbligherà lo spirometro a segnare lo stesso numero di gradi. Se però in corso di esperimento la temperatura atmosferica si eleva o si abbassa di 1° ad esempio, allora perchè si mantenga lo stato di equilibrio è necessario che anche l'aria mantellare aumenti o diminuisca di 1°. In tal modo la temperatura dell'aria mantellare non essendo più rispetto a quella iniziale superiore di *t* gradi, ma invece più elevata o più bassa, aumenterà o diminuirà di volume e lo spirometro darà indicazioni più elevate o più piccole.

Come le oscillazioni di temperatura, anche quelle della pressione atmosferica modificano le indicazioni, che lo spirometro darebbe per il solo calore emanato dalla sorgente calorifica entro il calorimetro.

Ad eliminare queste influenze esterne, Rubner ha disposto, al lato del primo, un secondo calorimetro della stessa forma e dimensione, detto *calo rimetro di correzione.*

Il calorimetro e lo spirometro I servirebbe quindi per segnare l'influenza sull'aria del mantello.

1° del calore emanato dalla sorgente calorifica;

2° dei cambiamenti di temperatura e pressione dell'ambiente.

Il calorimetro e lo spirometro II servirebbe invece a notare l'influenza sull'aria del proprio mantello:

dei soli mutamenti di temperatura e pressione atmosferica.

Ove il valore delle indicazioni dell'uno fosse uguale a quello dell'indicazione dell'altro, allora la differenza delle indicazioni dell'uno e dell'altro rappresenterebbe esclusivamente il grado d'influenza esercitata sull'aria del mantello, dal calore emesso dalla sorgente calorifica.

Il foro di entrata del calorimetro di ricerca è chiuso mercè un disco di legno spesso che fa da cattivo conduttore del calore irradiato dalla sorgente calorifica. Questo pezzo di legno, applicato con l'intermediario di un anello piatto di caucciù alla base del calorimetro la mercè di un sistema di viti, è provvisto di un foro centrale del diametro di cm. 18, capace per farvi passare animali di piccola taglia, che non pesino oltre i 4 5 kgr; lo spazio *A* non può contenere di più grossi.

Questo foro, dopo l'introduzione dell'animale, è chiuso ermeticamente con un disco di legno spesso.

In tutto il tempo di ricerca, nelle ricerche su animali, si suole rinnovare l'aria dello spazio *A*. Questo rinnovamento si fa aspirando dell'aria dal tubo *a* mercè una pompa ad acqua; l'aria nuova entra pel tubo laterale *b* posto vicino la base del calorimetro; lungo la comunicazione tra la pompa aspirante e il tubo *a* si interpone un esatto gassometro.

Poichè l'aria ventilatrice trasporta seco una parte del calore emesso dalla sorgente calorifica, calore che scappa alle indicazioni dello spirometro, è bene tener conto, in un colla quantità di aria aspirata nell'unità di tempo,

della differenza di temperatura, che ha l'aria all'entrata e all'uscita dal calorimetro.

A questo scopo due esatti termometri a $^1/_{10}$ di grado sono posti:

l'uno poco distante dal tubo *b* del calorimetro, dalla irradiazione del del quale è protetto mercè uno schermo di cartone spesso:

l'altro entro il tubo *a*, che presenta una branca rivolta in alto, appunto destinata per conficcarvi attraverso un tappo di caucciù, il termometro; il bulbo di questo corrisponde quindi al centro del tubo *a* ed è avvolto dall'aria ventilatrice nel momento stesso di uscita dal calorimetro.

Per sapere ora quante calorie sono trasportate dall'aria ventilatrice, bisogna:

a) tradurre in grammi i litri di aria passati nell'unità di tempo;

b) moltiplicare questo numero di grammi per 0.2374, che è il calore specifico dell'aria a pressione costante;

c) infine moltiplicare il prodotto ottenuto per la differenza dei due termometri di entrata e di uscita.

Quando le ricerche calorimetriche si praticano su animali, allora si dee tenere conto anche delle perdite di calore per evaporazione. Queste perdite, dice Rubner (*Die Quelle der thier. Wärme.* - Zeitsch. f. Biologie, vol. XXX, pagina 114), non stanno in rapporto con quelle emesse per irradiazione e conduzione.

È perciò necessario determinare i grammi di vapor d'acqua ceduto dall'animale nell'unità di tempo. Ed allora moltiplicando per 0.6, giusto le indicazioni dello stesso Rubner, i grammi trovati di vapor d'acqua, si sa quante grandi calorie ha perduto l'animale per evaporazione nell'unità di tempo. Per misurare la quantità di vapor d'acqua ceduto dall'animale in un tempo determinato, bisogna misurare il grado di umidità e dell'aria ambiente e di quella ventilatrice. Ciò lo si può facendo passare l'aria o attraverso una cassetta ermeticamente chiusa contenente un esatto igrometro a capello, come pratica Rubner, oppure attraverso tubi pieni di cloruro di calcio o un palloncino con pietra pomice imbevuta di acido solforico. Io mi sono servito di tubi ripieni di cloruro di calcio.

Una serie di tre tubi ad U va interposta tra il tubo *a* del calorimetro e il gassometro, in modo tale che, mercè un sistema di rubinetti, vi si possa in modo rapido ed a volontà far passare una determinata quantità di aria aspirata dal calorimetro. Un'altra serie di tubi si destina per l'esame dell'umidità dell'aria ambiente. Dopo il passaggio dell'aria ciascuna serie di tubi va pesata in una bilancia analitica. Per mezzo di calcoli è facile conoscere i grammi di vapor d'acqua contenuti in più in quella quantità di aria ventilatrice, che attraversa il calorimetro nell'unità di tempo.

I gradi di sollevamento, subito dalla campanella dello spirometro comunicante col calorimetro, non ci dànno il valore assoluto in calorie del calore assorbito dall'aria mantellare. Anzi vi ha dippiù, e cioè, i gradi di sollevamento della campanella non sono proporzionali alle quantità di calore cedute dalla sorgente calorifica al calorimetro. Ciò dipende, secondo Rubner

dal fatto che il calorimetro ad aria si mostra assai più sensibile per le piccole che per le grandi quantità di calore.

È necessario quindi conoscere il valore assoluto di una divisione nei varii gradi di sollevamento della campanella, e ciò s'ottiene mercè un *esatto campionamento*, ponendo cioè nel calorimetro varie sorgenti calorifiche di valore conosciuto e dividendo il numero di calorie orarie cedute pel numero dei gradi di sollevamento, avuti nello stato di equilibrio..

Sia ad esempio la quantità di calore emesso in un'ora dalla sorgente calorifica ugnale a 9 grandi calorie; siano 1.640 le calorie trasportate dall'aria di ventilazione, 7.360 saranno le calorie cedute all'aria mantellare; siano 368 le divisioni percorse dall' indice dello spirometro quando è raggiunto l'equilibrio, allora il valore calorico orario di ciascun grado è $\frac{7.360}{368} = 0.02$.

Si procede allo stesso modo con sorgenti calorifiche di forza maggiore o minore, ed allora trovati i valori di 1° nei differenti gradi di sollevamento della campanella, si può costruire una tabella, in cui mercè i calcoli di interpolazione sono segnati ordinariamente i valori orari di una divisione quando il sollevamento è a 100, 200, 300, 400, ecc. È in questo modo che io ho potuto conoscere in misura assoluta le indicazioni del calorimetro, che ho avuto per le mani. Nella tabella che qui inserisco è segnato:

1° a sinistra, in una colonna il sollevamento raggiunto dalla campanella per la presenza della sorgente calorifica, nella colonna contigua il quoziente della divisione tra le calorie cedute all'aria mantellare e le divisioni percorse dall'indice dello spirometro;

2° a destra, in una colonna i gradi di sollevamento da 200 a 700, nella colonna contigua corrispondente il valore di 1°, calcolato per interpolazione sui due valori inseriti nelle due colonne della metà sinistra.

Valore trovato col campionamento		Valore calcolato per interpolazione	
Gradi di sollevamento	Valore di 1°	Gradi di sollevamento	Valore di 1°
195	0. 01767	200	0. 01772
274	0. 01856	250	0. 01829
357	0. 01950	300	0. 01885
369	0. 01965	350	0. 01944
465	0. 02080	400	0. 02002
478	0. 02101	450	0. 02060
497	0. 02124	500	0. 02127
585	0. 02234	550	0. 02191
694	0. 02370	600	0. 02252
		650	0. 02314
		700	0. 02377

Varie sorgenti calorifiche di valore conosciuto sono state adoperate pel campionamento.

Rubner si è servito di un lungo e stretto tubo di piombo, avvolto a spira, che si introduce nel calorimetro e lo si fa attraversare da acqua calda. Conoscendo la quantità di acqua fluita nell'unità di tempo e la differenza di temperatura presentata dall'acqua al momento di entrata ed uscita dal calorimetro, è facile calcolare il numero di calorie cedute dalla spirale di piombo al calorimetro ed all'aria di ventilazione. Io ho dovuto però abbandonare questo metodo perchè non ostante il necessario complicato dispositivo per ottenere che tutta l'acqua fluita presenti nei vari intervalli di tempo uguali differenze di temperatura non ci sono riuscito ed ebbi risultati disparati.. Per cui dovetti servirmi del campionamento coll'elettricità, che presenta il triplice vantaggio, di non richiedere un dispositivo complicato, di potere calcolare esattamente le calorie cedute al calorimetro, di non obbligare a seguire minuto per minuto, come si dovrebbe nel precedente metodo, il funzionamento degli apparecchi messi in opera.

Pel campionamento coll'elettricità sono necessari:

1° Una spirale di argentana o di platino, tenuta sospesa nel centro del calorimetro mercè due grossi fili di rame, che siano fissati allo sportello di legno del calorimetro e sporgano alcuni cm. fuori in modo da potersi innestare mercè serra fili i conduttori della corrente. Io mi sono servito di una spirale della resistenza di 1 ohm;

2° Uno o più accumulatori, oppure un certo numero di pile capaci di fornire una corrente di intensità costante e di sviluppare nella spirale un numero orario di calorie tali da riscaldare e distendere l'aria mantellare sino ad avere 900-1000 gradi di sollevamento della campanella; a me sono bastate 8 pile Bunsen per il campionamento riportato nella tabella sopra inserita;

3° Un amperometro esattissimo, che basta sia diviso ad $\frac{1}{20}$ per avere dei valori precisi; l'amperometro mi fu fornito dal Gabinetto di fisica della nostra Università, al cui direttore prof. Macaluso ed all'assistente prof. Corbino colgo qui l'opportunità di esternare i sentimenti della più viva gratitudine per l'appoggio prestatomi nel praticare questo campionamento;

4° Un reostato, pel quale si intercala nel circuito una certa resistenza che poi al bisogno può diminuirsi appena che l'intensità della corrente mostri di volere abbassarsi; in questo modo l'intensità della corrente si può mantenere costante per tutto il tempo del campionamento; il reostato serve anche a limitare il numero di *Ampere*, che si riconoscono necessari per produrre un dato sollevamento della campanella.

Aprendo il circuito, la corrente elettrica che attraversa la spirale di argentana, produrrà in questa una quantità di calore, che secondo la legge di *Joule* è nell'unità di tempo proporzionale alla resistenza della spirale ed al quadrato della intensità della corrente. La formula è la seguente:

$$W = \frac{I^2 R \times 3600}{Q} = I^2 R \times 0.865.$$

Impiegando una spirale di argentana, che, com' io ho fatto, abbia un ohm di resistenza, si semplifica il calcolo, poichè basta conoscere l' intensità della corrente, e moltiplicare il quadrato degli *Ampere* per 0.865 per sapere il numero di calorie prodottesi in un'ora entro il calorimetro.

Vediamo ora quali proprietà debbono possedere il calorimetro e lo spirometro, quali condizioni debba presentare la stanza destinata alle ricerche calorimetriche, quali norme debbonsi osservare nell'esperimento.

Il calorimetro deve essere, all' interno perfettamente annerito per favorire l'assorbimento del calore emesso dall'animale, all'esterno perfettamente lucido ed, ove lo si voglia, anche spalmato di una vernice bianca per diminuire il più possibile la dispersione di calore all'esterno.

Dovendo esperimentare su animali, bisogna munire l' interno del calorimetro di una graticola di ferro cilindrica, separata dalla parete mercè pezzi di sughero e ció allo scopo di impedire il contatto dell'animale colla parete del calorimetro.

Prima di essere adoperati e durante l'uso è necessario assicurarsi dell' impermeabilità dei due apparecchi.

Per l'impermeabilità del calorimetro si procede nel seguente modo:

Si innesta al tubo laterale *c* un tubo di caucciù e a questo poi un tubo a T, che per un capo si connette con un manometro a mercurio, per l'altro capo con un compressore qualunque di aria, con una pera di gomma per esempio che funzioni da pompa premente ed aspirante.

Con questo compressore di aria si spinge nello spazio mantellare tanta aria da determinare una pressione positiva capace di equilibrare nel manometro una colonna di mercurio alta 60-80 mm. Se dopo 12-24 ore il manometro si trova con dislivello invariato, allora è certo che lo spazio mantellare è impermeabile. Se invece il manometro si trova con dislivello minore, allora i tratti di saldatura, ove per lo più sogliono riscontrarsi i punti di scappata dell'aria compressa nello spazio mantellare, si bagnano con una soluzione di sapone mediocremente concentrata; i punti permeabili saranno rivelati dalle bollicine di sapone, prodotte dalle fughe dell' aria compressa, e si ottureranno con saldature di stagno. La prova dovrà ripetersi più volte sino a che si è assicurati dell' impermeabilità.

Per l' impermeabilità dello spirometro si procede nel seguente modo:

Si eleva la campanella di tanto che resti sommersa per soli 4-5 cm., e poi dopo avere chiuso il tubo *d*, si pongono sulla campanella tanti pesi quanti bastano per elevare di 3-4 cm. il livello dell'olio di vasellina. Se dopo 6-12 ore l' indice dello spirometro non è tornato indietro, allora è certo che la campanella non perde; in caso contrario bisognerà riparare i tratti di saldatura.

Si deve poi graduare la sensibilità dello spirometro, procurare cioè che la campanella si possa elevare al massimo di altezza mercè la più debole pressione. Rubner vuole che la resistenza della campanella a sollevarsi sino al massimo di altezza sia superata da una pressione di 2.04 mm. d' acqua uguale a 0.15 mm. di mercurio.

Io sono riuscito, graduando il contropeso *r*, a neutralizzare di tanto la re-

sistenza della campanella che questa potea essere elevata con una pressione di 1.9 — 2.00 mm. d'acqua.

Sono riuscito anche ad ottenere che i due spirometri, messi entrambi in comunicazione collo spazio mantellare di uno stesso calorimetro e lasciati tali per più di un giorno, segnassero in modo uguale le influenze sull'aria mantellare delle oscillazioni di temperatura e pressione atmosferica.

E quando poi ciascun spirometro lo feci comunicare collo spazio mantellare del relativo calorimetro, ebbi la fortuna di riscontrare che le indicazioni dell'uno erano identiche a quelle dell'altro appena che avvenivano, mutamenti nella temperatura e nella pressione dell'aria ambiente. In questo modo nelle esperienze, che io impresi insieme al dott. Dolce, bastava che io deducessi dalle indicazioni dello spirometro I quelle dello spirometro II, per conoscere l'influenza, che aveva esercitato sull'aria mantellare il calore dell'animale contenuto nel calorimetro di ricerca.

Quando i due spirometri non segnano ugualmente per una stessa influenza determinatasi sui due calorimetri, allora é per il campionamento che bisognerà conoscere il valore relativo delle indicazioni dei due spirometri.

La stanza destinata per le ricerche calorimetriche, tranne della parete in cui è aperta la finestra per la illuminazione dell'ambiente, parete che deve essere molto spessa ed esposta a nord, sia dapertutto circondata da altre stanze. Inoltre occupi il piano inferiore del fabbricato. Tutto ciò per avere un ambiente che nel corso delle giornate di esperienze non subisca oscillazioni rapide di temperatura.

I due calorimetri saranno posti nel centro della stanza e sopraelevati dal pavimento di almeno un metro da un sostegno di legno a giorno, di modo che attorno ad essi possa liberamente circolare l'aria. I due calorimetri alla loro volta saranno separati l'uno dall'altro da una distanza di due metri al più e per maggior precauzione il calorimetro II si proteggerà con uno schermo di cartone dall'irradiazione del calorimetro I.

Accanto ad ogni calorimetro va posto un tavolinetto per situarvi lo spirometro.

Siamo pervenuti alle norme da seguire nella ricerca calorimetrica.

La comunicazione dello spirometro collo spazio mantellare del calorimetro è fatta mercè due tubi di gomma, collegati da un tubo di vetro a T, alla cui terza branca libera si innesta un terzo tubo di gomma provvisto di una pinza a vite. Anche il tubo di gomma che corre tra lo T e il tubo *c* del calorimetro è munito di pinza a vite. Questa disposizione ha lo scopo di intercettare a volontà la comunicazione dello spirometro sia coll'esterno o collo spazio mantellare.

Prima di introdurre nello spazio di ricerca del calorimetro la sorgente calorifica, bisogna elevare le campanelle dei due spirometri sino a che l'indice segni almeno 100°, quindi si intercetta la comunicazione coll'esterno.

Introdotta la sorgente calorifica si fa funzionare la pompa, limitando la forza di aspirazione a seconda dei casi.

Nella prima ora di ricerca, tempo necessario a un dipresso perchè si

raggiunga l'equilibrio, le indicazioni dei due spirometri, dei due termometri e del gassometro si segneranno ogni 20 minuti; dopo poi si segneranno ogni 5-10 minuti.

La pressione atmosferica basta segnarla a principio, a metà ed a fine di ricerca, quando questa è di corta durata, e quando si nota che le vicissitudini atmosferiche non sono tali da far temere delle oscillazioni rapide nella pressione atmosferica.

Durante lo stato di equilibrio, a varii intervalli si saggerà il grado di umidità dell'aria ambiente e dell'aria ventilatrice.

Appena la campanella si è di tanto sollevata da essere prossima ad innalzarsi sul livello del liquido, bisognerà intercettare la comunicazione collo spazio mantellare, aprire invece quella dell'esterno, per svuotare l'aria raccoltasi nella campanella. Bisognerà intanto notare il punto che segna l'indice prima e dopo che si è abbassata la campanella.

Io per non tenere conto delle due indicazioni procedevo in questo modo: appena che dal punto 100, in cui si poneva a principio della ricerca, perveniva l'indice dopo un giro completo a 180, chiudeva la comunicazione collo spazio mantellare e teneva aperta quella coll'esterno sino a che l'indice compiva tornando indietro un giro completo; fermavo l'indice a 180. In questo modo, come dalla tabella qui riportata a dimostrazione del metodo da me tenuto nelle ricerche calorimetriche, i numeri dei gradi segnati nei vari intervalli di tempo formano una serie numerica non interrotta ma progressiva.

Nel calcolo basta al numero di gradi segnati in ogni colonna sottrarre 100 per sapere il grado massimo di elevazione raggiunto sino a quel momento dalla campanella.

Ricerca calorimetrica (Serie XII) — *Esperienza 1ª* — *Periodo 1º*.

Ora	12	12.20	12.40	1	1.10	1.20	1.30	1.40	1.50	2	2.10	2.20	2.30	2.40	2.50	3	3.10	3.20	3.30	3.40	3.50	4
Spirometro I	100	360 + 57	+ 178	+ 248	+ 261	+ 273	+ 289	+ 299	+ 306	+ 313	+ 316	+ 317	+ 329	+ 332	+ 328	+ 326	+ 326	+ 319	+ 320	+ 322	+ 327	+ 326
Spirometro II	100	105	109	114	116	119	118	118	117	117	120	120	124	125	124	121	120	115	116	118	120	120
Temperatura aria ventilatrice	17°4	18°6	20°	20°5	20°7	20°8	20°9	20°9	20°9	21°1	21°1	21°1	21°1	21°2	21°2	21°3	21°3	21°3	21°3	21°3	21°3	21°3
Temperatura ambiente	17°4	17°5	17°5	17°6	17°6	17°6	17°6	17°6	17°6	17°6	17°6	17°65	17°7	17°7	17°65	17°6	17°6	17°6	17°6	17°6	17°6	17°6
Gassometro	89	114	138	163.4	175.7	188	200.4	211.9	220.8	232.4	243.9	255.5	265.4	274.6	285	295.9	306.7	317.6	329.3	337.4	346.4	356.9
Barometro	756									756												756

Igrometro chimico per l'aria ventilatrice:
dopo il passaggio di litri 40 aumentò in peso gr. 0.0361

Igrometro chimico per l'aria ambiente:
dopo il passaggio di litri 40 aumentò in peso gr. 0.0294

Istituto d'Igiene della R. Università di Palermo

INFLUENZA DEI GANGLI LINFATICI

NELLA PRODUZIONE DELL'IMMUNITÀ

VERSO LE MALATTIE INFETTIVE

RICERCHE SPERIMENTALI

DEI

Prof. LUIGI MANFREDI e Dott. PIETRO VIOLA

Dalle numerose ricerche del dott. G. Perez, eseguite in questo Istituto per suggerimento e con la guida di uno di noi, sul comportamento del sistema ganglionare linfatico rispetto ai microrganismi, è risultato che i gangli linfatici possiedono queste due importanti proprietà: 1. di trattenere nel loro stroma più o meno a lungo i microbi saprofiti o patogeni, che invadono l'organismo, tanto da contenerne un certo numero quasi sempre, anche nelle condizioni fisiologiche; 2. di determinare sui batteri patogeni, ai quali danno ricetto, un'attenuazione più o meno notevole della loro virulenza [1].

Stabilito quindi, in tal modo, che il sistema ganglionare linfatico costituisce uno tra i principali mezzi di difesa per l'organismo, sia nel tutelarlo contro le continue invasioni microbiche, mediante un' azione quasi di arresto verso i batteri invasori, sia nell'esercitare più particolarmente in caso d'infezione avvenuta un valido aiuto a prò di esso, ricettando e attenuando nel proprio tessuto i batteri patogeni, rimane ad esaminare un terzo lato della questione: in qual modo, cioè, il detto sistema ganglionare si comporti nella immunizzazione dell'organismo contro gli agenti infettivi.

I risultati sperimentali ottenuti da Perez, nelle prime due parti del lavoro, che formarono oggetto delle sue ricerche, fanno convergere

1 *Parassitismo microbico latente nei gangli linfatici normali*. Questi Annali, 1897, pag. 276.
I gangli linfatici nelle infezioni. Ibid. 1898, pag. 1.

appunto il più vivo interesse su questa terza parte. Che cosa, difatti, si verifica nell'organismo sotto l'influenza di questo parassitismo microbico latente nelle condizioni normali? È tale parassitismo un fatto indifferente, o non costituisce forse esso il substrato di quelle immunizzazioni, che si possono pur dire *latenti*, perchè continuamente e lentamente acquistate nel corso della vita senza pagarle a prezzo di alcuna malattia, ma quasi, come per effetto di un conflitto invisibile con gli agenti morbigeni? E, d'altra parte, dato il caso di una infezione superata, il microbismo specifico latente che segue a questa e si protrae più o meno a lungo nei soli gangli linfatici, e quivi subisce varie fasi fino alla soppressione della virulenza e poi della vita del germe specifico, non è probabile forse che abbia una gran parte nella produzione di quell'immunità, che segue alla guarigione del processo infettivo?

Mossi da tali considerazioni, abbiamo preso a studiare la possibilità, il meccanismo e gli effetti della *immunizzazione per mezzo del sistema ganglionare linfatico*, verso due importanti batteri patogeni: l'uno ad azione eminentemente infettiva, il *bacillo del carbonchio*, l'altro ad azione prevalentemente tossica, il *bacillo del tifo*. Abbiamo aggiunto altresì a queste alcune poche ricerche fatte con la *tossina difterica*.

A questo scopo era importante adottare un modo d'inoculazione dei virus, che ne determinasse la immediata ed esclusiva penetrazione nella rete vasale linfatica, e indi nei gangli, evitando la possibilità di una penetrazione iniziale in altri tessuti e sopratutto nel circolo sanguigno. Tra i modi a ciò rispondenti erano quelli, studiati anche da Perez, della *introduzione del virus a traverso la cute integra* mercè lo sfregamento, oppure della *inoculazione nella camera anteriore dell'occhio* a traverso la cornea; per entrambo le quali vie il Perez dimostrò, che le piccole dosi di batteri anche molto virulenti, come il carbonchio, per animali anche molto recettivi, come le cavie o i conigli, possono penetrare nell'organismo soffermandosi più o meno tempo nei gangli linfatici, senza produrre l'infezione.

Abbiamo preferito la via della camera anteriore dell'occhio, come quella che oltre ad una maggiore facilità ed esattezza di operazione, si presta anche meglio per una determinazione possibilmente precisa della quantità del virus da inoculare, rendendo così le esperienze sistematiche e comparabili fra loro.

La camera anteriore dell'occhio si può in effetti considerare come una grande lacuna linfatica, che trovasi in comunicazione diretta esclusivamente coi vasi linfatici della regione, ed è facilmente accessibile dall'esterno a traverso la membrana corneale, priva di vasi sanguigni; per

modo che riesce agevole limitare per tale via la penetrazione del virus al solo sistema linfatico. Tutto sta a non ferire i vasi sanguigni delle vicinanze. Con un po' di esercizio, si raggiunge pienamente lo scopo. La tecnica da noi usata era la seguente.

TECNICA.

Immobilizzato l'animale sul tavolo da operazione, si fa un abbondante lavaggio del sacco congiuntivale con acqua sterilizzata, indi mercè adatta pressione esercitata con le dita lungo il bordo palpebrale, si fa protundere il bulbo dell'orbita e mantenendolo in tale posizione con l'aiuto di due striscie di cotone idrofilo, si punge la cornea con finissimo ago-cannula lievemente arroventato, e si penetra nella camera anteriore evitando di approfondire molto l'ago, per non ferire menomamente nè l'iride nè la pupilla. Aspettasi che venga fuori l'umor acqueo, il quale esce per la ferita corneale, senza bisogno di ritirare l'ago della siringa; e subito dopo si inietta il liquido di coltura, che può essere contenuto al massimo da ciascuna delle camere nella quantità di 0,2-0,3 cc. nei conigli e 0,1-0,2 cc. nelle cavie.

Operando in tal modo si ha la maggiore probabilità di non ferire la congiuntiva; la quale pure, talvolta, anche senza che l'operatore se ne accorga, può venir lesa, o per lieve movimento dell'animale, o per spostamento del bulbo, oppure per un previo stato infiammatorio della stessa; ed allora gli effetti locali consecutivi all'infezione (ad esempio la chemosi congiuntivale, la panoftalmite, ecc) rivelano che si è battuto una falsa strada.

Per praticare gli innesti dai gangli, abbiamo seguito la stessa tecnica adottata da Perez e sottoposta da lui ai più rigorosi controlli. Eccola riassunta qui in breve.

Appena morto l'animale. o ucciso con un colpo alla nuca, si pratica una accurata disinfezione della pelle, e con strumenti sterilizzati si mettono successivamente allo scoperto le regioni cervicale, ascellare e inguinale, avendo cura di operare in un ambiente tranquillo. Dopo aver lavato la regione già scoperta con soluzione sterilizzata di cloruro sodico a titolo fisiologico, si sgusciano i gangli dal tessuto cellulo adiposo che li involge. Si sottopongono a ripetuti lavaggi in diverse provette contenenti soluzione fisiologica di cloruro di sodio, per togliere qualche po' di sangue che si trovasse appiccicato alla superficie di essi, e infine si depositano sulla parete interna di provette sterilizzate. Quivi con forbice sterilizzata e usando di ovvie precauzioni, si tagliuzzano finamente, prelevando in ultimo dal materiale così ridotto in poltiglia, parecchie anse che vengono insemenzate in agar per farne delle colture isolanti.

Dopo avere così presi gli innesti dai gangli sottoioidei, carotidei, ascellari ed inguinali, si apre l'addome per eseguire con la tecnica accennata anche degli innesti dai gangli mesenterici.

Furono sempre fatti, inoltre, innesti di controllo dal peritoneo, dalla milza e dal sangue degli animali in esperimento, con la tecnica generalmente adottata per questi casi.

I. — Immunizzazione dei conigli e delle cavie al carbonchio.

Le prime esperienze da noi fatte per orientarci in proposito, con l'inoculazione di colture di carbonchio nella camera anteriore dell'occhio di conigli e di cavie, confermarono il fatto interessante già notato da Perez, che, mentre le dosi modiche del virus uccidono gli animali con notevole ritardo, le dosi molto piccole invece non producono nè la morte nè alcun disturbo apprezzabile; quantunque anche in questo secondo caso sia dimostrabile la presenza del bacillo carbonchioso in vari punti dell'organismo.

Questo fatto tanto più notevole in quanto che era finora risaputo come l'inoculazione (per qualunque altra via) anche di quantità assolutamente minime di bacilli del carbonchio bastasse per uccidere i conigli e sopratutto senza alcuna eccezione le cavie, dimostrava fin da principio come, in quanto a suscettibilità verso l'infezione carbonchiosa, il sistema linfatico dovesse reagire in maniera diversa da quella di tutti gli altri tessuti dell'economia.

Ciò posto, abbiamo creduto di dover tracciare per le nostre ricerche il seguente programma:

1. Determinare, nei conigli e nelle cavie, *la dose letale minima* di virus carbonchioso che si può introdurre per la camera anteriore dell'occhio.

2. Vedere se, con inoculazioni ripetute per la detta via di quantità progressivamente crescenti di virus, a cominciare da quantità non letali, si potesse rendere refrattari i detti animali all'azione di dosi letali ed anche poi all'introduzione del virus per la via sottocutanea.

3. Indagare, su gli animali inoculati con dosi letali e non letali, e in quelli sottoposti alla immunizzazione il destino del virus introdotto nella camera anteriore, il cammino che esso fa, le modificazioni che eventualmente subisce, nonchè d'altra parte le possibili reazioni o i mutamenti originantisi nell'organismo sotto l'influenza di esso (potere battericida, chemiotassi, stato di nutrizione, ecc.).

Adoperammo come liquido d'inoculazione culture di carbonchio in brodo di 48 ore, sviluppate nel termostato a 37°. Queste colture provenivano dal sangue di una cavia inoculata con fili di seta sporiferi, preparati e conservati in laboratorio, la cui virulenza era tale da uccidere le cavie in circa 36 ore.

Per misurare con esattezza le piccole quantità del liquido di coltura da inoculare, ci siamo serviti di apposite pipette di vetro a calibro molto ristretto e accuratamente graduate, in modo da avere escursioni relativamente ampie del liquido nell'istrumento misuratore. In tal modo si è potuto dosare con sufficiente facilità e precisione anche $\frac{1}{50}$ di cc. di brodocoltura, che è stata la più piccola quantità inoculata.

L'inoculazione nella camera anteriore si fa nel modo descritto innanzi. In quanto agli effetti locali consecutivi all'operazione, diciamo qui una volta per tutte quello che notammo, qualunque sia stato il virus in esperimento. Dopo la prima inoculazione, essendo l'ago un po' arroventato, intorno al punto leso della cornea si formava un opacamento, dovuto ad un processo d'infiammazione reattiva del tessuto circostante.

Nei giorni consecutivi pure scomparendo il processo infiammatorio, restava in corrispondenza del punto leso una piccola macchia bianca, rappresentante il tessuto connettivo formatosi per la perdita di sostanza della cornea. Quasi contemporaneamente compariva spesso l'opacamento della lente cristallina, costituendosi una vera cataratta, da attribuirsi o al disturbo nutritivo immediato, od al trauma. Ripetendosi l'inoculazione nel medesimo occhio, si ripetevano gli stessi effetti, per cui l'opacamento della cornea si estendeva a quasi tutta la parte centrale con l'aspetto di un leucoma centrale. Nelle successive inoculazioni inoltre si avevano fenomeni reattivi da parte dell'iride, formandosi infine una iridite plastica, con sinecchie posteriori.

In alcuni casi però, quando la congiuntiva era previamente infiammata, in seguito alla seconda o terza puntura insorgeva un processo di panoftalmite con consecutiva formazione di microftalmo.

Ecco ora i risultati delle esperienze:

1. Determinazione della dose letale minima per la camera anteriore dell'occhio. — Sono raccolti nella seguente tabella i risultati ottenuti per le cavie ed i conigli. Non sono riportati, naturalmente, i casi nei quali vi fu qualche ferita accidentale della congiuntiva o dell'iride e quindi penetrazione del virus nel sangue.

TABELLA I.

NUMERO d'ordine	PESO dell'animale	QUANTITÀ di brodocoltura inoculata	ESITO
		A. — CAVIE.	
1ª	285	1|40 cc	+ dopo 69 ore
2ª	302	»	» 95 »
3ª	294	»	» 84 »
4ª	345	»	» 116 »
5ª	320	»	» 94 »
6ª	374	»	» 128 »
7ª	610	»	» 115 »
8ª	590	»	» 127 »
9ª	550	»	» 139 »
10ª	210	»	» 93 »
11ª	254	»	» 70 »
12ª	260	»	» 120 »
13ª	265	»	» 122 »
14ª	235	»	» 101 »
15ª	501	»	» 108 »
16ª fino a 30ª	240-275	1|50 cc.	Tutte vive
		B. — CONIGLI.	
1°	1020	1|10 cc.	+ dopo 63 ore
2°	958	1|20 cc.	» 117 »
3°	843	»	» 113 »
4°	1020	»	» 114 »
5°	1095	»	» 90 »
6° fino a 16°	800-1500	1|80 — 1|40 cc.	Tutti vivi

Esperienze di controllo furono fatte inoculando a varî conigli e cavie, *nel sottocutaneo*, dosi di carbonchio eguali a quelle usate nelle esperienze della tabella I, e si ebbe per risultato:

Conigli inoculati nel sottocutaneo.

con $\frac{1}{10}$ cc. . . . . morte dopo 48-58 ore

con $\frac{1}{30}$ cc. . . . . » 58-68 »

Cavie inoculate nel sottocutaneo.

con $\frac{1}{30}$ cc. . . . . morte dopo 44-60 ore

con $\frac{1}{40}$ cc. . . . . » 45-55 »

con $\frac{1}{50}$ cc. . . . . » 48-52 »

Inoltre dalla coltura in brodo di carbonchio di 48 ore, e con le dosi suddette, si fecero delle piastre per conoscere approssimativamente il numero dei bacilli contenuti in ciascuna dose. Come media di parecchie analisi si ebbe:

da $\frac{1}{50}$ cc. . . . . lo sviluppo di 290-334 colonie

da $\frac{1}{40}$ cc. . . . . . . » 392-425 »

da $\frac{1}{30}$ cc. . . . . . . » 456-585 »

da $\frac{1}{20}$ cc. . . . . . . » 620-684 »

Cosicchè risulta evidentemente da questa prima serie di esperienze, che, effettuandosi l'inoculazione del virus carbonchioso nella camera anteriore dell'occhio in conigli e cavie, si hanno *dosi non letali*, le quali cioè sono incapaci di produrre l'infezione, e *dosi letali minime*, che determinano la morte del maggior numero di animali solo con un ritardo più o meno notevole; dosi le quali, intanto, contengono ancora un discreto numero di bacilli, e inoculate per altra via, uccidono senza fallo i detti animali con poco o nessun ritardo. [1]

[1] Il Sobernheim (*Zeitsch. für Hygiene und Infectionsk*, 1897, XXV 309-311) ha recentemente dimostrato che quando la coltura di carbonchio è molto virulenta, bastano *alcuni pochi germi* o *anche uno solo* (*nur einen oder höcsthens ganz vereinzelte lebensfähige Keime*) per produrre egualmente la morte così nelle cavie e nei topi, come nei conigli, quando l'inoculazione venga fatta nel sottocutaneo.

La *dose letale minima* della coltura di carbonchio da noi adoperata rimane dunque fissata: per i conigli ad $\frac{1}{20}$ di cc., cioè *una goccia normale;* per le cavie ad $\frac{1}{40}$ di cc., cioè *mezza goccia normale.* Il peso dell'animale non pare che abbia in ciò una influenza molto apprezzabile.

2. Immunizzazione. — Stabiliti questi fatti, passammo a sperimentare l'effetto di inoculazioni ripetute nella stessa camera anteriore, con quantità progressivamente crescenti di virus, procedendo da dosi non letali a dosi una o più volte letali. Tra una inoculazione e l'altra si aspettava che l'animale fosse completamente ristabilito, e per questo più che l'andamento del peso del corpo, che non era un fattore apprezzabile (v. appresso), serviva di criterio e di norma l'esperienza fatta su altri animali a titolo di saggio. Si ottennero i risultati seguenti:

TABELLA II.

Inoculazioni ripetute con dosi crescenti di carbonchio nella camera anteriore.

N. d'ordine	I INOCULAZIONE			II INOCULAZIONE			III INOCULAZIONE			IV INOCULAZIONE			OSSERVAZIONI
	Data	Peso dell' animale	Quantità di coltura	Data	Peso dell' animale	Quantità di coltura	Data	Peso dell' animale	Quantità di coltura	Data	Peso dell' animale	Quantità di coltura	
							A — CAVIE.						
1a	26 nov.	401	1/50 cc.	31 dic.	446	1/40 cc.	21 gennaio	460	1/40 cc.	5 febbr.	475	1/30 cc.	
2a	28 dic.	380	»	6 gennaio	365	»	25 »	380	1/30 cc.	6 »	401	»	
3a	22 nov.	325	»	»	300	»	28 »	310	»	8 »	325	»	Morta 96 ore dopo per ferita della congiuntiva.
4a	14 genn.	265	»	29 »	330	1/30 cc.	9 febbr.	340	1/20 cc.	21 »	358	»	
5a	5 febbr.	570	»	20 febbr.	560	1/40 cc.	21 marzo	540	1/30 cc.	1 aprile	557	»	
6a	4 marzo	325	»	15 marzo	345	»	29 »	405	»	12 »	428	»	
7a	9 marzo	320	»	21 »	360	»	1 aprile	415	»	16 »	424	»	
8a	9 marzo	330	»	»	320	»	»	350	»	»	...	...	Morta 106 ore dopo per ferita della congiuntiva.
9a	8 febbr.	515	»	18 febbr.	572	»	1 marzo	550	»	10 marzo	...	»	
							B. — CONIGLI.						
1o	24 dic.	1494	1/40 cc.	6 gennaio	1500	1/30 cc.	21 gennaio	1540	1/20 cc.	5 febbr.	1600	1/10 cc.	
2o	27 »	1625	»	15 »	1610	»	28 »	1635	»	15 »	1650	»	
3o	13 gennaio	1060	»	29 »	1105	»	9 febbr.	1150	»	22 »	1200	»	
4o	»	1200	»	»	1495	»	»	1470	»	...	...	...	Morto 58 ore dopo per ferita della congiuntiva.
5o	18 »	1570	»	1 febbr.	1570	1/30 cc.	16 »	1655	»	27 »	1690	»	
6o	»	1005	»	»	895	»	»	1405	1/30 cc.	»	1520	»	
7o	22 »	800	»	5 »	845	1/30 cc.	...	...	...	...	...	...	Morto 74 ore dopo per ferita della congiuntiva.
8o	19 marzo	1250	»	21 marzo	1260	1/30 cc.	1 aprile	1270	1/20 cc.	9 aprile	1274	»	
9o	»	980	»	28 »	1050	»	6 »	1040	»	15 »	1160	»	

Questi risultati dimostrano come si possa nei conigli e nelle cavie aumentare la relativa refrattarietà, di cui la camera anteriore dell'occhio è dotata verso il carbonchio, mediante inoculazioni ripetute di virus, fino al punto da *immunizzarla* contro dosi tali, che sarebbero sicuramente letali se inoculate per la stessa via in animali di controllo.

Si nota che già dopo una prima inoculazione fatta con dose non letale, l'animale può nella seconda inoculazione ricevere la dose minima letale, e poi nella 3ª e 4ª inoculazione delle dosi multiple di quest'ultima. Il tempo trascorso fra una inoculazione e l'altra ha oscillato, in media, fra 10 giorni ed un mese.

Quale era pertanto il significato da darsi a questo fatto della immunizzazione ottenuta per la camera anteriore dell'occhio, in animali, come i conigli e le cavie, dei quali si sa l'estrema difficoltà pei primi e l' impossibilità pei secondi ad immunizzarsi contro il carbonchio? Potevasi trattare di un fatto esclusivamente locale, cioè, per esempio, di una distruzione del virus in loco, oppure di un qualsiasi impedimento alla diffusione di esso nell'organismo, senza che questo in realtà ne risentisse alcun effetto generale?

Era dunque importante vedere, per risolvere tale dubbio, se gli animali cosí immunizzati per la camera anteriore, presentassero un certo grado di resistenza rispetto alle inoculazioni del virus fatte per qualunque altra via, ad esempio quella sottocutanea. A tal'uopo le cavie ed i conigli precedenti, che erano sopravvissuti alle ripetute inoculazioni endoculari, vennero assoggettati alla inoculazione sottocutanea di una dose piccolissima, ma sicuramente letale, della cultura di carbonchio in brodo di 48 ore; in caso di sopravvivenza, si ripeteva l' inoculazione sottocutanea ancora una o più volte, con dosi via via maggiori.

TABELLA III.

Inoculazioni di carbonchio nel sottocutaneo degli animali sopravvissuti della Tabella II.

N. d'ordine	I INOCULAZIONE			II INOCULAZIONE			III INOCULAZIONE			IV INOCULAZIONE			OSSERVAZIONI
	Data	Peso dell' animale	Quantità di coltura	Data	Peso dell' animale	Quantità di coltura	Data	Peso dell' animale	Quantità di coltura	Data	Peso dell' animale	Quantità di coltura	
							A. — CAVIE.						
1a	16 febbr.	513	1/50 cc.	4 marzo	540	1/30 cc.	15 marzo	600	1/30 cc.	28 marzo	607	1/10 cc.	
2a	26 »	420	»	10 »	428	»	28 »	450	»	8 aprile	460	»	
3a	2 marzo	380	1/40 cc	20 »	385	1/30 cc.	1 aprile	400	»	12 »	421	»	Morta dopo 10 giorni per coccidiosi diffusa.
4a	1 aprile	560	»	10 aprile	584	»	21 »	525	1/10 cc.	1 maggio	588	1/5 cc.	
5a	20 »	450	1/20 cc	30 »	465	»	12 magg.	480	»	20 »	488	»	
6a	»	420	1/30 cc.	»	434	»	10 »	450	»	»	454	»	Morta dopo 14 giorni per coccidiosi al fegato e milza.
7a	20 marzo	588	1/40 cc.	2 aprile	565	1/30 cc	14 aprile	570	»	22 aprile	581	»	
							B. — CONIGLI.						
1o	16 febbr.	1758	1/40 cc.	4 marzo	1790	1/20 cc.	15 marzo	1845	1/10 cc.	28 marzo	1880	1/5 cc.	
2o	25 »	1662	»	8 »	1670	»	20 »	1690	»	31 »	1701	»	
3o	5 marzo	1220	»	15 »	1288	»	27 »	1245	»	6 aprile	1258	»	
4o	10 »	1700	»	22 »	1722	»	1 aprile	1710	»	10 »	1722	1/2 cc.	Morto 82 ore dopo per coccidiosi diffusa al fegato, milza e polmone.
5o	15 »	1600	1/20 cc.	28 »	1790	»	6 »	1620	»	15 »	1770	»	
6o	15 aprile	1235	»	24 aprile	1820	1/10 cc.	1 maggio	1884	1/5 cc.	12 maggio	1851	»	
7o	24 »	1200	»	2 maggio	1241	»	...	...	...	...	...	...	Morto 144 ore dopo per rottura del bulbo oculare.

La prima vaccinazione endoculare, dunque, non è solo l'esponente di un fatto locale; ma essa ha influenza su tutto l'organismo, per modo che gli animali si mostrano poi immunizzati anche contro l'introduzione del virus per la via naturalmente tanto suscettibile del tessuto sottocutaneo.

Qui è da notare, che quando la prima inoculazione sottocutanea è fatta con dose molto piccola

$$\left(\frac{1}{50} - \frac{1}{40} \text{ cc. per le cavie; } \frac{1}{40} - \frac{1}{30} \text{ cc. per i conigli}\right),$$

tutti gli animali resistono, mostrandosi poi capaci di ricevere impunemente quantità di virus gradatamente crescenti, fino a raggiungere quelle enormi di $\frac{1}{2}$ — 1 cc.

Quando invece la prima inoculazione sottocutanea è fatta con dose troppo forte, *una goccia* per esempio o poco meno, alcuni animali soccombono. Ciò dimostra che l'immunizzazione, una volta iniziata e ottenuta fino ad un certo grado con le inoculazioni endoculari, può essere rinforzata e spinta ad un grado altissimo mediante le successive inoculazioni sottocutanee.

Innanzi a questi risultati, non è fuor di luogo il ricordare come tutte le ricerche finora fatte per immunizzare i conigli e le cavie contro il carbonchio, stante l'estrema sensibilità di questi animali per il virus carbonchioso, non hanno approdato che a risultati o completamente negativi o dubbi ed incerti. Per quanto riguarda le cavie, anzi, è in generale ammessa l'opinione che una immunizzazione attiva non sia assolutamente possibile. [1]

In quanto ai conigli, le opinioni, così come i metodi ed i risultati delle esperienze fatte, sono difformi e contradittorii; difatti mentre Roux e Chamberland [2] già nel 1887 sarebbero riusciti a produrre un'immunizzazione rapida in questi animali, mediante il metodo delle inoculazioni preventive coi vaccini Pasteur, introducendone grandi quantità nelle vene, e recentemente Sobernheim avrebbe ottenuto lo stesso effetto anche con l'inoculazione sottocutanea di vaccini esattamente preparati e dosati, d'altra parte anche recentemente N. Melnikow-Raswedenkow [3] in una lunga serie di esperienze dimostrava che l'immunizzazione attiva

[1] SOBERNHEIM, *Ueber active und passive Milzbrandimmunität.* Zeitsch. f. Hyg. u. Infekt. 1898. XXV.

[2] *Immunisation des lapins au charbon.* Annales de l'Inst. Pasteur, 1897, I.

[3] *Ueber künstliche Immunitat der Kaninchen gegen Milzbrand.* Zeitsch. f. Hygiene und Infectionsk., 1897, XXV, 225.

dei conigli non dà risultati costanti con alcun metodo, che le inoculazioni endovenose dei vaccini Pasteur per lo più abbassano piuttosto che rinforzare la resistenza dei conigli al carbonchio, che i conigli vecchi qualche volta resistono anche ad un carbonchio virulento, e che infine anche per questi ultimi l' aver superato una volta l'infezione, non è indizio sufficiente per ritenere che non abbiano a morire in una seconda prova.

Comunque sia, è certo però, che neppure nei conigli è stata mai da alcuno tentata con successo l' immunizzazione, non già ricorrendo ai vaccini carbonchiosi o virus più o meno attenuati, ma direttamente e fin da principio avvalendosi del *carbonchio virulento.*

Tale impossibilità, del resto, risulta chiara dalle stesse esperienze di Sobernheim [1], dalle quali si rileva che anche *un solo* o *pochi germi del carbonchio virulento* sono capaci di uccidere quasi tutti i conigli, ai quali vengono inoculati.

Se dunque con le inoculazioni endoculari ripetute di carbonchio virulento, conigli e cavie non solo non muoiono, ma s' immunizzano solida mente al carbonchio ; ciò vuol dire che il virus carbonchioso penetrando per il sistema linfatico, subisce o induce nell'organismo modificazioni ben diverse da quelle, che si hanno quando sia qualunque altra la via di penetrazione. Il sistema linfatico assume, per conseguenza, una importanza speciale nel meccanismo dell' immunizzazione, importanza che merita di essere precisata e approfondita.

3° Meccanismo dell' immunizzazione. — Il primo quesito che si presenta nello studio di tale problema, è quello di sapere che cosa avviene del virus carbonchioso inoculato nella camera anteriore dell'occhio, in ciascuno dei due casi esaminati : cioè così quando gli animali sopravvivono, come quando soccombono alla inoculazione.

A questo scopo si prendono due lotti di animali, ognuno composto di otto o dieci cavie ed altrettanti conigli, e si inocula : agli animali del 1° lotto nell'occhio la *dose minima letale* della cultura di carbonchio in brodo di 48 ore (cioè, come si è stabitito innnanzi, $\frac{1}{40}$ cc. per le cavie, e $\frac{1}{20}$ cc. per i conigli), ed agli animali del 2° lotto egualmente nell'occhio una *dose non letale* della stessa coltura, (cioè $\frac{1}{50}$ cc. per le cavie e $\frac{1}{30}$ cc. per i conigli). Indi si procede alla uccisione degli animali inoculati, con vario intervallo di tempo tra l'uno e l'altro, ma parallelamente per i due lotti, ed alla ricerca della diffusione e distribuzione dei bacilli del carbonchio nell'organismo.

---

[1] Op. cit.

Gli animali venivano uccisi con un colpo sulla nuca, e precisamente nell'ordine che segue: un 1° immediatamente dopo l'inoculazione, un 2° dopo un'ora, un 3° dopo 6 ore, un 4° dopo 24 ore, e così di seguito di 24 in 24 ore fino alla morte per quelli inoculati con la dose minima letale: con lo stesso ordine fino al quinto giorno si procedeva per quelli inoculati con dose non letale, salvo che per questi gli ultimi venivano uccisi dopo parecchio tempo, per determinare il tempo della scomparsa dei bacilli dall'organismo.

La tecnica adoperata per la ricerca dei bacilli nell' organismo mediante culture isolanti, per quanto concerne il modo di prelevare gl'innesti dai gangli linfatici, è stata descritta in principio di questo lavoro.

Qui aggiungeremo solo alcune particolarità. Da ogni animale si facevano sette innesti in agar, e quindi sette piastre isolanti, con materiale preso da questi diversi punti dell'organismo: camera anteriore, sangue, peritoneo, milza, gangli carotidei, gangli sottocutanei, gangli mesenterici. Il materiale era attinto sempre con la stessa ansa di platino, e nella misura di cinque anse di *pappa* (milza, gangli), o di cinque anse di *liquido* (camera anteriore sangue, peritoneo). Le piastre venivano esaminate sempre dopo 48 ore di dimora nel termostrato a 37°.

I risultati sono raccolti nelle seguenti tabelle:

TABELLA IV.

Animali uccisi in serie vario tempo dopo l'inoculazione nella camera anteriore della « dose minima letale » di carbonchio.

Numero d'ordine	INTERVALLO tra inoculazione e uccisione	N°. DI COLONIE SVILUPPATESI NELLE PIASTRE						
		dalla camera anteriore	dai gangli carotidei	dai gangli sottocutanei	dai gangli mesenterici	dal peritoneo	dal sangue	dalla milza
	A. — CAVIE.							
1	Immediatamente	200	Nessuna	Nessuna	Nessuna	Nessuna	Nessuna	Nessuna
2	1 ora	190	4	»	»	»	»	»
3	6 ore	143	12	4	»	»	»	»
4	24 »	84	30	25	»	»	»	»
5	48 »	72	68	40	»	»	»	»
6	72 »	40	75	33	»	»	»	»
7	96 »	32	70	25	8	3	45	53
8	130 morte	74	104	59	40	45	1050	502
	B. — CONIGLI.							
1	Immediatamente	505	Nessuna	Nessuna	Nessuna	Nessuna	Nessuna	Nessuna
2	1 ora	498	»	»	»	»	»	»
3	6 ore	494	8	1	»	»	»	»
4	24 »	470	81	33	»	»	»	»
5	48 »	473	104	45	»	»	»	»
6	72 »	394	152	28	3	1	4	3
7	96 »	200	184	40	32	12	13	34
8	137 morte	320	342	200	143	39	384	Innumerevoli

TABELLA V.

Animali uccisi in serie vario tempo dopo l'inoculazione nella camera anteriore di una « dose non letale » di carbonchio.

Numero d'ordine	INTERVALLO tra inoculazione e uccisione	N°. DI COLONIE SVILUPPATESI NELLE PIASTRE						
		dalla camera anteriore	dai gangli carotidei	dai gangli sottocutanei	dai gangli mesenterici	dal peritoneo	dal sangue	dalla milza
	A. — CAVIE.							
1	Immediatamente	150	Nessuna	Nessuna	Nessuna	Nessuna	Nessuna	Nessuna
2	1 ora	65	1	»	»	»	»	»
3	6 ore	60	15	»	»	»	»	»
4	24 »	42	50	2	»	»	»	»
5	48 »	38	55	17	»	»	»	»
6	72 »	24	20	22	»	»	»	»
7	96 »	13	14	6	»	»	»	»
8	120 »	8	20	4	»	»	»	»
9	192 »	1	8	Nessuna	»	»	»	»
10	288 »	Nessun.	2	»	»	»	»	»
	B. — CONIGLI.							
1	Immediatamente	401	Nessuna	Nessuna	Nessuna	Nessuna	Nessuna	Nessuna
2	1 ora	475	»	»	»	»	»	»
3	6 ore	385	19	»	»	»	»	»
4	24 »	487	88	24	»	»	»	»
5	48 »	258	102	85	»	»	»	»
6	72 »	210	100	10	»	»	»	»
7	96 »	180	108	16	»	»	»	»
8	120 »	180	80	12	»	»	»	»
9	192 »	11	17	8	»	»	»	»
10	288 »	Nessun.	1	Nessuna	»	»	»	»

Dalle esperienze così condotte si possono dunque trarre le seguenti conclusioni:

1.° Negli animali (cavie e conigli) inoculati con la *dose minima letale*, i bacilli del carbonchio già poche ore dopo l'inoculazione endoculare passano nei gangli carotidei ed indi in quelli sottocutanei, ove, così nei primi come nei secondi, si arrestano per qualche tempo. Solo dopo il 3° o 4° giorno cominciano ad irrompere in tutti gli altri organi, nei quali poscia si moltiplicano; e dopo circa altri 3 o 4 giorni determinano la morte.

Il ritardo della morte di questi animali sembra quindi che si debba ascrivere ad una duplice ragione: in primo luogo al fatto che il virus compie una prima tappa nel sistema ganglionare linfatico, che ne impedisce per qualche tempo l'espansione; ed in secondo luogo ad una influenza *debilitante* che esso deve subire nel detto sistema ganglionare, per cui anche quando ne viene fuori ed invade altri organi, presenta una diminuzione della sua facoltà riproduttiva, specialmente nel sangue, e quindi un'attenuazione della sua virulenza.

2.° Quando l' inoculazione endoculare è fatta con *dose inferiore alla letale*, i bacilli si trovano egualmente poche ore dopo nei gangli carotidei, e dopo circa 24 ore anche nei sottocutanei, ma non vanno più oltre; essi restano in vita nei detti gangli per vari giorni, e poi sono quivi gradatamente uccisi, fino a scomparire del tutto dopo circa 12-15 giorni. La sopravvivenza quindi di questi animali e la consecutiva loro immunizzazione, evidentemente, dipende dal fatto che i gangli linfatici sono in grado di arrestare e trattenere in vita per alcuni giorni tutti i bacilli, che oltrepassano la camera anteriore dell'occhio; cosicchè il campo della lotta fra virus ed organismo si restringe in questo caso esclusivamente al sistema ganglionare linfatico.

Quanto alla camera anteriore dell' occhio, sede dell' inoculazione, non pare che essa abbia alcuna speciale influenza sia nel primo che nel secondo caso. Nel primo caso, cioè quando gli animali muoiono, i bacilli del carbonchio subiscono in essa una progressiva diminuzione di numero, però vi persistono in una certa quantità fino alla morte dell'animale; nel secondo caso la diminuzione progressiva dei bacilli, che si verifica in una misura alquanto più rapida, arriva fino alla scomparsa di essi, però solo tardivamente, e cioè appena qualche giorno prima della scomparsa totale dei bacilli anche dai gangli. Ma ciò non ha importanza per l' immunizzazione, perchè è dimostrato dalle esperienze di Perez che lo stesso effetto, cioè la localizzazione dei bacilli nei gangli, può ottenersi con la inoculazione di dosi non letali di carbonchio *per la via cutanea mediante sfregamento*, cioè data la pene-

trazione esclusiva del virus nel sistema linfatico per una via diversa da quella della camera anteriore.

Ora limitata ogni influenza nella produzione dell'immunità al solo apparato ganglionare linfatico, è uopo ritenere che questo, nella sua lotta contro il virus, o metta in giuoco dei fattori suoi propri, diversi da quelli già noti nell'organismo (potere battericida, fagocitosi), oppure agisca esaltando questi ultimi di una speciale maniera.

Per raccogliere dei dati sperimentali, grazie ai quali si potesse fare un po' di luce su tale quistione, abbiamo proceduto in questo modo: abbiamo sottoposto alla immunizzazione nel modo anzidetto per la camera anteriore dell'occhio, una serie di animali (cavie e conigli), prendendo in esame le variazioni che per effetto del trattamento si verificassero nel potere battericida del sangue e nella chemiotassi, nonchè quelle relative al peso del corpo ed alla temperatura.

Ecco i risultati di queste indagini:

Vennero messi in esperimento quattro cavie e altrettanti conigli, ognuno sottoposto a quattro successive inoculazioni endoculari, con quantità crescenti, della coltura di carbonchio in brodo di 48 ore.

TABELLA VI.

Andamento del peso del corpo e della temperatura durante l'immunizzazione.

DATA	CAVIA I		CAVIA II		CAVIA III		CAVIA IV	
	Peso gr.	Temper. C°	Peso gr.	Temper. C°	Peso gr.	Temper. C°	Peso gr.	Temper. C°
A. — Cavie.								
1ª *Inoculazione*								
Prima	310	38.2	362	38.4	650	38.0	455	38.6
Dopo 1 giorno	295	38.5	385	38.6	585	38.5	380	37.7
» 2 giorni	295	38.0	330	38.1	615	38.0	360	37.5
» 3 »	295	38.3	350	38.5	625	38.2	350	37.9
» 4 »	300	38.0	360	38.6	605	38.1	355	38.0
» 5 »	300	37.9	365	38.8	625	38.6	365	38.0
» 6 »	308	37.6	371	38.1	675	38.2	370	38.1
» 7 »	300	37.5	380	38.0	670	38.1	370	38.4
» 8 »	310	38.8	390	38.5	610	38.3	385	38.1
» 9 »	315	38.1	400	38.2	600	38.4	380	38.8
» 10 »	317	38.0	395	38.1	585	38.1	395	37.7
» 11 »	328	37.9	401	38.0	625	38.4	415	37.8
2ª *Inoculazione.*								
Prima	328	37.9	401	38.0	655	38.4	415	31.8
Dopo 1 giorno	305	38.1	360	38.4	570	38.1	400	38.1
» 2 giorni	298	38.8	365	38.2	564	38.7	398	38.4
» 3 »	315	38.5	385	38.6	554	39.0	388	38.6
» 4 »	310	38.4	370	38.4	Morta per ferita della congiuntiva.		340	39.2
» 5 »	300	38.7	350	38.8	»		Morta per ferita della congiuntiva.	
» 6 »	320	38.2	370	38.2	»		»	
» 7 »	320	38.2	370	38.1	»		»	

DATA	CAVIA I		CAVIA II		CAVIA III		CAVIA IV	
	Peso	Temper.	Peso	Temper.	Peso	emper.	Peso	Temper.
Dopo 8 giorni	825	88.1	865	88 8	»		»	
» 9 »	825	88.2	875	88.2	»		»	
» 10 »	810	88 4	880	88 4	»		»	
» 11 »	290	88.0	870	88 1	»		»	

3ª *Inoculazione.*

DATA	CAVIA I Peso	CAVIA I Temper.	CAVIA II Peso	CAVIA II Temper.	CAVIA III Peso	CAVIA III Temper.	CAVIA IV Peso	CAVIA IV Temper.
Prima	290	88.0	870	88.1	»		»	
Dopo 1 giorno	820	88.7	865	88.8	»		»	
» 2 »	810	88.4	860	88.1	»		»	
» 8 »	810	88.4	890	88.4	»		»	
» 4 »	220	88 4	890	88.5	»		»	
» 5 »	825	88.8	884	88.2	»		»	
» 6 »	810	88.5	880	88.8	»		»	
» 7 »	820	88.5	865	88.8	»		»	
» 8 »	825	88.2	860	88.1	»		»	
» 9 »	828	88 2	848	88.2	»		»	
» 10 »	820	88.1	250	88.0	»		»	
» 11 »	800	88.2	856	88.1	»		»	

4ª *Inoculazione.*

DATA	CAVIA I Peso	CAVIA I Temper.	CAVIA II Peso	CAVIA II Temper.	CAVIA III Peso	CAVIA III Temper.	CAVIA IV Peso	CAVIA IV Temper.
Prima	270	88.2	856	88.1	»		»	
Dopo 1 giorno	272	88.8	850	88.2	»		»	
» 2 giorni	268	88.1	845	88.4	»		»	
» 8 »	270	88.1	848	88 1	»		»	
» 4 »	281	88.0	855	88.0	»		»	
» 5 »	285	88.0	829	87 9	»		»	
» 6 »	290	87 9	861	88 1	»		»	
» 7 »	295	87.9	870	87.7	»		»	
» 8 »	298	87 7	884	88.0	»		»	
» » 9	295	87.6	880	88.1	»		»	

B. — Conigli.

1ª. Inoculazione.

DATA	CONIGLIO I		CONIGLIO II		CONIGLIO III		CONIGLIO IV	
	Peso	Temper.	Peso	Temper.	Peso	Temper.	Peso	Temper.
Prima	1670	38.1	1750	37.1	1930	38 2	2270	38.5
Dopo 1 giorno	1600	37.4	1650	37.5	1880	37.9	2215	38.9
» 2 »	1610	37.9	1680	37.7	1815	38	2130	39.4
» 3 »	1585	38.1	1695	37.2	1880	39.3	Morto 60 ore dopo per rottura del bulbo oculare.	
» 4 »	1595	38.2	1680	37.7	Morto 31 ore dopo per coccidiosi.		»	
» 5 »	1695	38.7	1695	38.4	»		»	
» 6 »	1700	38.9	1820	39	»		»	
» 2 »	1680	39.2	1850	38.1	»		»	
» 8 »	1650	40.2	1770	39.2	»		»	
» 9 »	1620	39.1	1670	38.2	»		»	
» 10 »	1645	39.5	1670	38.1	»		»	

2ª. Inoculazione.

DATA	Peso	Temper.	Peso	Temper.				
Prima	1645	39.5	1670	38.1	»		»	
Dopo 1 giorno	1640	38.6	1650	38.4	»		»	
» 2 »	1682	39	1684	38.2	»		»	
» 3 »	1640	38.7	1680	38.4	»		»	
» 4 »	1645	38.5	1655	38.6	»		»	
» 5 »	1655	38	1648	31.1	»		»	
» 6 »	1640	38 4	1674	38.1	»		»	
» 7 »	1638	38.6	1680	38.3	»		»	
» 8 »	1610	38.5	1625	38.1	»		»	
» 9 »	1600	38.1	1640	38	»		»	
» 10 »	1515	38.4	1662	38	»		»	

3ª. *Inoculazione.*

DATA	CONIGLIO I		CONIGLIO II		CONIGLIO III		CONIGLIO IV	
	Peso	Temper.	Peso	Temper.	Peso	Temper.	Peso	Temper.
Prima	1515	38.4	1662	38	»		»	
Dopo 1 giorno	1500	38.8	1644	38.3	»		»	
» 2 »	1500	38.5	1640	38 5	»		»	
» 3 »	1580	38.3	1648	38.2	»		»	
» 4 »	1585	38.2	1654	38.2	»		»	
» 5 »	1575	38.9	1670	38.1	»		»	
» 6 »	1580	38.2	1648	38.3	»		»	
» 7 »	1582	38 3	1690	38 2	»		»	
» 8 »	1570	38.5	1675	38	»		»	

4ª. *Inoculazione.*

DATA	CONIGLIO I		CONIGLIO II		CONIGLIO III		CONIGLIO IV	
	Peso	Temper.	Peso	Temper.	Peso	Temper.	Peso	Temper.
Prima	1570	38.5	1675	38	»		»	
Dopo 1 giorno	1620	38 8	1670	38.2	»		»	
» 2 »	1600	39	1644	38.4	»		»	
» 3 »	1609	39.5	1655	38.4	»		»	
» 4 »	1650	39.1	1674	38.1	»		»	
» 5 »	1680	38.6	1680	38.1	»		»	
» 6 »	1604	38.8	1675	38	»		»	
» 7 »	1620	38.1	1662	37 9	»		»	
» 8 »	1628	38.1	1680	37.9	»		»	
» 9 »	1660	38	1684	38.1	»		»	

Per l'esame del *potere battericida del sangue* si è adoperato il metodo generalmente usato in tale ricerca.

TABELLA VII.

Saggio del potere battericida del sangue prima e dopo l'immunizzazione.

NUMERO d'ordine	Prima dell'immunizzazione				Dopo l'immunizzazione			
	Immediatamente	Dopo 1|2 ora	Dopo 6 ore	Dopo 24 ore	Immediatamente	Dopo 1|2 ora	Dopo 6 ore	Dopo 24 ore
A. — CAVIE.								
Cavia I	400	300	2500	Innum.	560	390	160	5000
Cavia II.	310	400	1380	»	435	322	201	1475
Cavia III	540	460	Innum.	»	»	»	»	»
Cavia IV	600	520	»	»	»	»	»	»
B. — CONIGLI.								
Coniglio I. . . .	650	590	328	1480	600	488	202	375
Coniglio II . . .	700	606	6300	Innum.	594	468	113	2140
Coniglio III . . .	721	677	540	3186	»	»	»	»
Coniglio IV . . .	590	480	144	Innum.	»	»	»	»

In quanto alla *chemiotassi*, è noto com'essa sia *negativa* negli animali normali rispetto al carbonchio. Invece nelle due cavie e nei due conigli sopravvissuti alla immunizzazione, e nei quali si praticò tale ricerca mediante il metodo dei noti tubicini di vetro, parzialmente riempiti di coltura di carbonchio in brodo e quindi inoculati nel sottocutaneo, si ebbe per risultato: ora formazione di un grosso tappo leucocitico alla imboccatura del tubicino, ora penetrazione e parziale riempimento dell'interno di questo con leucociti, e disgregazione dei pochi bacilli rinvenuti al microscopio. In altri termini erano evidenti i segni di una chemiotassi in senso positivo.

Concludendo sui dati raccolti da queste esperienze fatte negli stessi animali prima e dopo e anche durante l'immunizzazione, si può stabilire :

1.° L'immunizzazione procede senza notevoli variazioni del peso del corpo e della temperatura degli animali. Nella 1ª inoculazione segue quasi costantemente una lieve diminuzione del peso, ed un aumento della temperatura, che non va al di là di un grado o di un grado e mezzo; ma nelle inoculazioni successive anche queste oscillazioni tendono a scomparire. Ciò non ostante è necessario che tra una inoculazione e l'altra passino parecchi giorni, se non si vuole che l'animale soccomba per una tipica infezione carbonchiosa.

2.° Negli animali immunizzati notasi un aumento del potere battericida del sangue, ma non molto considerevole, e manifestantesi piuttosto con un'azione ostacolante lo sviluppo dei bacilli, anzichè con un effetto di distruzione più o meno intensa dei medesimi.

3.° Ad animale immunizzato si ha chemiotassi positiva alquanto pronunziata.

Quale sia l'importanza da attribuirsi a questi diversi fatti, nella produzione dell'immunità per la via linfatica, si potrà considerare meglio dopo avere esposto ciò che avviene nella immunizzazione con altri virus per questa medesima via.

II. Immunizzazione al Tifo.

Per poter meglio chiarire e valutare la portata delle esperienze fatte col bacillo del carbonchio, era opportuno ripeterle con qualche altro microrganismo patogeno, il cui modo d'agire sull'organismo differisse da quello eminentemente infettivo e setticemico del germe carbonchioso. Abbiamo scelto il bacillo del tifo.

L'azione morbigena di questo corrisponde, com'è noto, molto più al quadro di un'intossicazione, che a quello di un'infezione, essendo limitato lo sviluppo del bacillo e poco espansivo il suo cammino nell'organismo; ma si tratta in fondo di un fenomeno misto, poichè il veleno specifico (una o più *toxoproteine*) è contenuto nel corpo bacillare, esso è quindi legato allo sviluppo del bacillo e non viene messo in libertà che con la morte e col disfacimento di questo. Abbiamo riprodotto con questo bacillo, salvo lievi varianti, tutta la serie delle precedenti esperienze.

1° DETERMINAZIONE DELLA DOSE MINIMA LETALE PER LA CAMERA ANTERIORE DELL'OCCHIO. — **Il materiale di cui ci siamo serviti è stata la coltura di tifo in agar di 24 ore. Tale coltura proveniva dalla milza di un tifoso, ed era stata più volte saggiata con esito positivo mediante la reazione di Widal sul sangue di ammalati di tifo.**

Prima di inocularla nella camera anteriore dell'occhio, ne fu determinata la virulenza (stabilendone la dose letale minima) mediante inoculazioni per altre vie, cioè peritoneo e sottocutaneo, in cavie e conigli. All'uopo ci siamo serviti come istrumento misuratore di un'ansa di platino esattamente pesata alla bilancia e capace di 2 mg della coltura in agar, e, come mestruo, della soluzione fisiologica sterilizzata di cloruro sodico in quantità non superiore ad 1 cc. per ogni inoculazione.

Trovammo che la dose letale minima nelle cavie di 250-300 gr. di peso era:

per il peritoneo. . . .	mg.	0,2
» sottocutaneo . .	»	16,0

ed in conigli del peso da 800-1000 gr.:

per il peritoneo. . . .	mg.	18,0
» sottocutaneo . .	»	23,0

Passando alle inoculazioni endoculari, malgrado che adoperassimo dosi molto superiori alle precedenti, non mai riuscimmo ad ottenere la morte degli animali.

Stante la capacità limitata della camera anteriore, per cui non era possibile introdurvi che pochissimi decimi di cc. di liquido, la quantità di coltura da emulsionarsi in questo non poteva essere spinta oltre un certo limite, compatibilmente col passaggio del materiale emulsionato attraverso il sottile ago della siringa.

La dose massima quindi che per tale via abbiamo potuto inoculare è stata di *50 mg.* per le cavie e *100 mg.* per i conigli; ma gli animali mostrarono di poter resistere a quantità di coltura anche molto maggiori di queste. Eppure la quantità massima adoperata per le cavie era tale da rappresentare, se inoculata nel peritoneo, *duecento cinquanta volte* la dose minima letale!

Sembra adunque doversi confermare anche rispetto al bacillo del tifo, il fatto messo in luce per il virus carbonchioso: che, cioè, le vie linfatiche ed in ispecie il sistema ganglionare linfatico sono dotati di fronte ai virus di un potere di resistenza molto superiore a quello di tutte le altre parti dell'organismo, e quindi debbono concorrere alla protezione e difesa di questo in un grado notevolmente alto.

2.° Immunizzazione. — Negli animali inoculati nella camera anteriore una sola volta, con quantità variabili di coltura di tifo, abbiamo poi saggiato se vi fosse immunizzazione generale, inoculando rispettivamente nel peritoneo e nel sottocutaneo dosi letali di virus per una o più volte, col risultato che si rileva dalle seguenti tabelle:

TABELLA VIII.

Prima inoculazione nella camera anteriore e consecutive nel peritoneo.

N. d'ordine	I Inoculazione		II Inoculazione		III Inoculazione		Esito
	Data	Quantità	Data	Quantità	Data	Quantità	
			A. — CAVIE.				
1a	25 novemb.	18 mg.	27 dicemb.	2/6 mg.	9 gennaio	8 mg.	Vive
2a	16 »	26 »	» »	3/5 »	» »	12 »	»
3a	1 dicemb.	22 »	» »	1 »	» »	22 »	»
4a	25 novemb.	28 »	» »	2 »	» »	15 »	»
5a	16 »	26 »	» »	2 »	10 »	30 »	»
6a	3 dicemb	38 »	1 gennaio	3 »	29 »	34 »	»
			B. — CONIGLI.				
1°	3 dicemb.	45 mg	1 gennaio	14 mg.	30 gennaio	30 mg.	Vive
2°	» »	35 »	3 »	24 »	4 febbraio	50 »	»
3°	» »	» »	» »	24 »	» »	60 »	»
4°	6 »	75 »	6 »	26 »	8 »	65 »	»

TABELLA IX.

Prima inoculazione nella camera anteriore e consecutive nel sottocutaneo.

N. d'ordine	I Inoculazione		II Inoculazione		III Inoculazione		Esito
	Data	Quantità	Data	Quantità	Data	Quantità	
			A. — CAVIE.				
1a	28 novemb.	19 mg	15 dicemb.	14 mg.	16 gennaio	26 mg.	Vive
2a	» »	28 »	» »	16 »	18 »	28 »	»
3a	29 »	35 »	18 »	20 »	24 »	30 »	»
4a	» »	48 »	22 gennaio	» »	12 febbraio	32 »	»
			B. — CONIGLI.				
1°	29 dicemb	60 mg.	22 gennaio	16 mg.	12 febbraio	26 mg.	Vive
2°	1 febbraio	75 »	2 marzo	26 »	29 marzo	38 »	»
3°	» »	90 »	» »	30 »	» »	45 »	»

Da ciò risulta, dunque, che per la via ganglionare linfatica si può ottenere una immunizzazione generale dell'organismo all'infezione tifosa, la quale va segnalata per la rapidità ed intensità con cui si stabilisce, sia perchè compare già dopo una sola inoculazione endoculare, sia perchè si manifesta sin da principio di un grado molto elevato.

3.° Meccanismo. — Abbiamo fatto inoltre in vari animali l'esame della temperatura e del peso del corpo durante l'immunizzazione per la camera anteriore, e così pure il saggio del potere battericida del sangue prima e dopo l'immunizzazione stessa. Non si è ripetuta qui, come per il carbonchio, la prova della chemiotassi, essendo noto che questa si presenta già positiva negli animali normali; nè è sembrato necessario di rifare le esperienze circa la diffusione del bacillo, e la durata vitale dello stesso nei vari organi, rilevandosi tali dati con sufficiente esattezza nelle esperienze già fatte da Perez.

In tutti gli animali si fece una sola inoculazione endoculare, secondo il massimo di capacità della camera anteriore, cioè nella dose di *50 mg.* per le cavie e *100 mg.* per i conigli; dopo la quale si procedette ai vari esami sopra mentovati. Per la tecnica usata in questi esami, veggasi quanto fu detto a proposito del carbonchio.

TABELLA X.

Variazioni della temperatura e del peso del corpo durante l'immunizzazione.

A. - CAVIE.

DATA	CAVIA I		CAVIA II		CAVIA III	
	Peso gr.	Temperat. C°	Peso gr.	Temperat. C°	Peso gr.	Temperat. C°
Prima	622	38.2	655	38	350	38.6
Dopo 1 giorno	570	39	580	39	300	39.6
» 2 »	565	39.4	582	39.2	270	39.6
» 3 »	555	38.8	592	38.6	275	39.9
» 4 »	560	37.9	592	38.6	260	39
» 5 »	552	40.4	545	38.3	275	38.5
» 6 »	608	38.2	622	38.4	280	38.2
» 7 »	615	38.5	635	38.2	270	38.6
» 8 »	625	38	635	38.1	290	38.1
» 9 »	613	38.2	615	38.2	290	38.1
» 10 »	660	38.5	645	38.3	298	38
» 11 »	695	38.8	675	38.5	300	38
» 12 »	680	38.5	643	38.3	310	38.2
» 13 »	690	38.2	655	38	321	38.1
» 14 »	660	38	625	38	320	38.1

B. - CONIGLI.

DATA	CONIGLIO I		CONIGLIO II		CONIGLIO III	
	Peso	Temperat.	Peso	Temperat.	Peso	Temperat.
Prima	1205	38.9	1250	38	1150	38
Dopo 1 giorno	1170	39.9	1200	39	1141	39
» 2 »	1197	38.9	1257	38.8	1100	39.5
» 3 »	1187	38.6	1242	39.1	1090	39.3
» 4 »	1200	38	1233	38.8	960	39.4
» 5 »	1192	37.9	1235	37.8	950	39.5
» 6 »	1215	38.2	1202	39.2	970	39.3
» 7 »	1155	39	1260	38.1	985	39.6
» 8 »	1118	39.6	1238	37.7	950	39
» 9 »	1150	39.6	1245	37.8	965	39.1
» 10 »	1120	39.3	1235	37.9	970	39
» 11 »	1023	39	1252	37.6	980	38.5
» 12 »	990	37.6	1260	37.7	980	38.2
» 13 »	994	37.9	1260	38	995	38.1
» 14 »	1160	37.8	1285	38	1001	38

TABELLA XI.

Variazioni del potere battericida del sangue in seguito all'immunizzazione.

NUMERO d'ordine	Prima dell'immunizzazione				Dopo l'immunizzazione			
	Immediatamente	Dopo ½ ora	Dopo 6 ore	Dopo 24 ore	Immediatamente	Dopo ½ ora	Dopo 6 ore	Dopo 24 ore
A. — CAVIE.								
Cavia I	400	300	225	Innum.	275	110	nessun.	nessun.
Cavia II. . . .	240	200	250	2010	304	281	14	22
Cavia III . . .	300	180	20	9000	330	202	16	140
B. — CONIGLI.								
Coniglio I. . .	340	1260	3000	5000	384	290	108	224
Coniglio II . .	350	225	Innum	Innum.	406	374	108	3000
Coniglio III. .	345	200	40	1050	300	209	10	103

Risulta dunque da queste esperienze, che anche per il tifo, analogamente a quanto si è visto per il carbonchio, l'immunizzazione per la via linfatica induce negli animali una reazione generale che si rivela con la diminuzione del peso del corpo, con l'innalzamento della temperatura, con l'aumento del potere battericida del sangue. Le variazioni relative al peso ed alla temperatura durano per il tifo più a lungo, che non per il carbonchio; ma similmente come nella immunizzazione carbonchiosa, esse non sono in generale molto rilevanti, come non è rilevante l'aumento del potere battericida, sopratutto ove si pensi agli effetti che si hanno nella immunizzazione tifica praticata per altre vie (peritoneo ad esempio), e si rifletta inoltre che qui, per la camera anteriore dell'occhio, un'immunità di alto grado è stata raggiunta con *una sola inoculazione di una dose fortissima di virus.*

III. — Immunizzazione alla tossina difterica.

Nelle esperienze col virus difterico si partì dal concetto che, trattandosi di un virus ad azione esclusivamente tossica, era possibile togliere

di mezzo ogni partecipazione diretta dell'agente vivo, inoculando nella camera anteriore dell'occhio il solo prodotto tossico dello stesso.

Quale sarebbe, in questo terzo caso, il modo di comportarsi del sistema ganglionare linfatico?

Preparammo all'uopo una certa quantità di tossina difterica col metodo generalmente usato, mediante filtrazione di colture molto attive di difterite ottenute in brodo Spronk, ed aggiunta al liquido filtrato del mezzo per cento di fenolo.

La tossicità di tale liquido fu innanzi tutto determinata per la via sottocutanea, in cavie e conigli, e si ebbero i seguenti valori riferibili alla dose minima letale:

nelle cavie. . . . . $\frac{1}{50}$ cc.

nei conigli. . . . . $\frac{1}{80}$ cc.

L'inoculazione invece dello stesso liquido nella camera anteriore dell'occhio diede, per la dose minima letale, questi altri valori:

nelle cavie. . . . . $\frac{1}{20}$ cc.

nei conigli. . . . . $\frac{1}{15}$ cc.

Si rileva da ciò che, per la via linfatica, gli animali possono resistere ad una dose di tossina maggiore circa del doppio di quello che è tollerabile per la via sottocutanea. È quindi da conchiudere, anche riguardo ai batteri esclusivamente tossici, come il bacillo della difterite, che l'organismo possiede naturalmente nel suo sistema ganglionare linfatico un presidio superiore agli altri, di cui esso è fornito.

Riguardo agli effetti immunizzanti delle inoculazioni subletali di tossina nella camera anteriore, abbiamo proceduto ad una lunga serie di esperienze nelle cavie e nei conigli, inoculando dapprima dosi ripetute e crescenti di tossina nell'occhio, e poi saggiando l'immunità per la via sottocutanea, come si vede nella tabella seguente:

TABELLA XII.

Prime inoculazioni nella camera anteriore, ultima nel sottocutaneo.

Numero d'ordine	I INOCULAZIONE			II INOCULAZIONE			III INOCULAZIONE			IV INOCULAZIONE			Esito
	Data	Peso	Quantità	Data	Peso	Quantità	Data	Peso	Quantità	Data	Peso	Quantità	
						A. — CAVIE.							
1ª	28 marzo	405	1/40 cc.	5 aprile	410	1/30 cc.	15 aprile	320	1/10 cc.	28 aprile	300	1/50 cc.	+ 86 ore
2ª	1 aprile	225	1/30 cc.	9 »	280	»	»	260	»	»	280	»	+ 70 »
3ª	5 »	285	»	15 »	210	»	23 »	220	»	2 maggio	240	1/40 cc.	+ 28 »
4ª	6 »	220	»	»	220	»	»	280	»	»	240	1/50 cc.	+ 64 »
5ª	11 »	160	»	17 »	215	»	24 »	220	»	»	245	»	+ 81 »
6ª	»	180	»	»	205	»	»	235	»	»	250	»	+ 60 »
7ª	»	235	»	»	280	»	»	300	»	»	245	1/40 cc.	+ 53 »
8ª	»	260	»	»	320	»	»	330	»	»	380	»	+ 50 »
9ª	»	160	»	»	205	»	»	280	»	»	255	»	+ 46 »
10ª	»	155	»	»	180	»	»	165	»	»	200	»	+ 56 »
						B. — CONIGLI.							
1°	22 marzo	1440	1/20 cc.	29 marzo	1577	1/10 cc.	5 aprile	1280	1/10 cc.	15 aprile	1840	1/30 cc.	+ 82 ore
2°	30 »	955	»	5 aprile	975	»	15 »	1000	»	28 »	1150	1/10 cc.	+ 60 »
3°	»	875	»	»	924	»	»	978	»	»	1005	»	+ 52 »
4°	5 aprile	870	»	15 »	990	»	23 »	1170	»	29 »	1185	1/40 cc.	+ 109 »
5°	12 »	1200	»	30 »	1330	»	25 »	1341	»	1 maggio	1354	»	+ 116 »
6°	»	1105	»	»	1125	»	»	1148	»	»	1154	1/30 cc.	+ 180 »

Orbene, da queste esperienze risulta che è bensì possibile di assuefare gli animali a tollerare per la camera anteriore dosi letali di tossina difterica, cioè di ottenere un certo grado d'immunizzazione in un tempo relativamente breve e in animali suscettibilissimi, ma non si è autorizzati a ritenere, almeno nei limiti delle esperienze fatte, che in questo modo si possa raggiungere una immunizzazione generale tale, da preservare l'organismo contro la penetrazione di dosi letali per una via diversa. Difatti nessuno degli animali è sopravvissuto alla prova di controllo, e solamente qualcuno è morto con un notevole ritardo.

È vero che si tratta di animali molto sensibili alla tossina difterica, e la cui immunizzazione attiva per qualunque via è estremamente difficile. Ma è pur vero che, considerando i risultati brillanti ottenuti con un'altra immunizzazione, altrettanto se non maggiormente ardua, quale è quella delle cavie al carbonchio, non si potrebbe in modo assoluto attribuire l'insuccesso incontrato nell'immunizzazione antidifterica a ragioni di ordine tanto generale; sibbene è da pensare piuttosto ad una eventuale diversità nel modo di comportarsi del sistema ganglionare linfatico rispetto ai batteri patogeni, secondo che questi agiscono in una maniera eminentemente tossica, come il bacillo della difterite, oppure in una maniera eminentemente infettiva o mista, come il bacillo del carbonchio e quello del tifo. Ma le ricerche su quest'ultimo punto meritano di essere continuate, e, prima di venire ad una conclusione, sarà bene ripeterle anche con qualche altra tossina batterica analoga, ad esempio quella del tetano.

Conclusioni generali.

Le nostre ricerche sono lungi dall'avere risoluto in maniera esauriente l'argomento preso a trattare; alcuni punti richiedono di essere confermati o più largamente illustrati, altri si presentano ancora avvolti dal buio; ma nel loro insieme esse dischiudono alla patologia microbica un campo che si può dire nuovo, o almeno non esplorato, cioè lo studio della immunità naturale ed acquisita in rapporto al sistema ganglionare linfatico.

Sopratutto esse acquistano una maggiore significazione quando sieno considerate unitamente alle ricerche precedenti di Perez, mosse da unico

concetto direttivo, e riguardanti il modo di comportarsi del sistema ganglionare linfatico rispetto ai microrganismi sia allo stàto normale, sia nelle infezioni, sotto due altri importanti rapporti: quello, cioè, del parassitismo microbico latente, e quello dell'attenuazione degli agenti morbigeni nell'interno dell'organismo.

L'insieme dei risultati ottenuti in questo campo, fin'oggi, è veramente tale da deporre per un complesso di attribuzioni e di influenze tutte proprie, speciali, inerenti alla funzionalità dei gangli linfatici nelle molteplici e multiformi fasi del conflitto fra germi patogeni ed organismo animale.

Limitandoci ai risultati bèn assodati che emergono dalle presenti ricerche, è evidente che si possono formulare le seguenti conclusioni generali:

1° Il sistema ganglionare linfatico è dotato di un grado di resistenza naturale ai virus (carbonchio, tifo, tossina difterica), superiore a quello di cui si mostrano forniti gli altri organi o tessuti del corpo animale.

2° Al sistema ganglionare linfatico devesi riconoscere una grande influenza nella produzione dell'immunità.

Per mezzo di esso è possibile l'immunizzazione al carbonchio delle cavie, che non è altrimenti attuabile, e quella dei conigli, che difficilmente si raggiunge per altre vie; come pure l'immunizzazione di entrambe queste specie animali all'infezione tifosa, in maniera così rapida ed intensa, come non si ha per nessun'altra via.

Appare invece assai difficile ottenere in questi stessi animali una considerevole immunizzazione alla tossina difterica.

3° Il meccanismo dell'immunizzazione per mezzo dei gangli linfatici risiede solo in parte in una reazione generale dei noti poteri difensivi dell'organismo (fagocitosi, potere battericida), i quali fattori presentano mutamenti che non sono proporzionati alla rapidità ed intensità dell'azione immunizzante, ma deve annidarsi, in parte altresì, nei gangli stessi, in proprietà bio-chimiche speciali del loro funzionamento.

4° Grazie a questa considerevole facoltà immunizzatrice dei gangli linfatici, per cui essi, sotto l'influenza di germi patogeni annidantisi nel loro stroma conferiscono facilmente l'immunità a tutto l'organismo, è possibile spiegare:

a) le immunità a varie malattie infettive che si acquistano quasi insensibilmente nel corso della vita, per effetto cioè di quei batteri patogeni che allo stato normale, superate le barriere tegumentarie dell'organismo, sono arrestati e conservano la loro vitalità per più o meno tempo nei gangli linfatici;

b) e una partecipazione del sistema ganglionare a quella immunità che segue alla guarigione di varie malattie infettive, conoscendosi che in questo caso, come dimostrarono le ricerche di Perez, i relativi batteri patogeni persistono ancora vitali per parecchio tempo nei gangli linfatici, quando sono scomparsi da tutte le altre parti dell'organismo.





